

Aus dem Max-von-Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
– Lehrstuhl Bakteriologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Heesemann

***Simultane Impfung und Therapie gegen
Milzbrand:***

***Ein dominant-negativer Inhibitor des
Protective Antigen von B. anthracis ist
gleichzeitig ein potentes und sicheres
Antigen für einen Impfstoff***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Benedikt August Aulinger
aus München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Karl-Heinz Herbinger

Priv. Doz. Dr. med. Michael Hogardt

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Julia Y Wang, PhD, Harvard Medical
School – Boston, USA

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2013

Meinen Eltern

1	Einleitung	8
1.1	Milzbrand in der Geschichte	8
1.1.1	Von der Antike bis zum Mittelalter	8
1.1.2	Frühe Erkenntnisse	9
1.1.3	Die Entdeckung von <i>B. anthracis</i> als Erreger des Milzbrands	10
1.1.4	Die Entwicklung von <i>B. anthracis</i> als Kampfstoff	11
1.1.5	<i>B. anthracis</i> und die Bedrohung des Bioterrorismus	12
1.2	Klinischer Verlauf der Milzbrandinfektion	13
1.2.1	Hautmilzbrand	13
1.2.2	Lungenmilzbrand	14
1.2.3	Darmmilzbrand	15
1.2.4	Milzbrand-Meningitis	16
1.3	Milzbrand in Deutschland	16
1.4	Bacillus anthracis	17
1.4.1	Morphologie	17
1.4.2	Kapsel und S-Layer	18
1.4.3	Das Toxin	20
1.4.3.1	Protective Antigen	24
1.4.3.2	Lethal Factor	26
1.4.3.3	Edema Factor	27
1.4.4	Die Anthrax Spore	28
1.5	Impfstoffentwicklung gegen B. anthracis	30
1.5.1	Attenuierte Lebendimpfstoffe	30
1.5.2	Impfstoffe basierend auf PA	31
2	Stand der Forschung und Fragestellung der Arbeit	33
2.1	Dominant-negative Inhibitoren von PA (DNI)	33
2.2	Konjugierter Impfstoff gegen Kapsel und Toxin des B. anthracis	34
2.3	Fragestellungen und Ziele der Arbeit	36
3	Material und Methoden	37
3.1	Isolierung und Degradierung von γ-D-Polyglutaminsäure (PGA)	37
3.1.1	Bakterienstamm, Inokulation und Kultivierung	37
3.1.2	Gewinnung und Reinigung der PGA	37
3.1.3	Degradierung der PGA	38
3.2	Herstellung der PGA-Protein Konjugate	39
3.3	Impfung der Mäuse	41

3.4	Bestimmung der Antikörperkonzentration (ELISA)	42
3.4.1	Beschichtung der ELISA-Platten	42
3.4.2	Messung der Antikörperkonzentration im Serum	42
3.5	Kompetitiver ELISA	43
3.6	Expositionsversuch der geimpften Mäuse mit PA und LF	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Herstellung und Reinigung der PGA	45
4.2	Konjugiertes PGA-PA, PGA-DNI und PGA-BSA	45
4.3	Antikörper gegen PA durch Impfung von PA und DNI	46
4.4	Antikörper gegen PA durch Impfung von PA- und DNI-PGA	51
4.5	Antikörper gegen PGA durch Impfung mit den PGA-Konjugaten	53
4.6	Anti-PA-Ak-Konzentration nach Impfung mit konjugierten vs. unkonjugierten Impfstoff	55
4.7	Protektion gegen LeTx	57
5	Diskussion	59
5.1	DNI ist ein stärkeres Antigen als PA	60
5.1.1	Verändertes Peptidpitop?	62
5.1.2	“Endosomaler Einschluss” und effektivere Antigenprozessierung von DNI?	63
5.2	DNI ist ein guter Träger für Konjugat-Impfstoffe	66
5.3	Einsatz von DNI zur Postexpositionsprophylaxe	68
5.4	Limitationen der Studie	70
6	Zusammenfassung	73
7	Literatur	75

Å	Ångström
AC	Adenylatzyklase
Ak	Antikörper
ANOVA	Univariate Varianzanalyse
ANTXR1/2	Anthrax Toxin Rezeptor 1/2
AP	alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zellen
Asp, D	Asparaginsäure
AVA	<i>Anthrax vaccine adsorbed</i>
AVP	<i>Anthrax vaccine precipitated</i>
B.	<i>Bacillus</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CyaA	Adenylatzyklase-Toxin
DNI	Dominant negativer Inhibitor
EdTx	<i>Edema Toxin</i>
EF	Edema Factor
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
g	Gramm
GI	Gastro-Intestinal
h	Stunde
HD ₅₀	50 %ige Hemmdosis
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
LD50%	50% Letale Dosis
LeTx	<i>Lethal Toxin</i>
LF	<i>Lethal Factor</i>
LRP6	<i>Lipoprotein-receptor-related protein 6</i>
Lys, K	Lysin
MHC II	<i>Major Histocompatibility Complex II</i>
min	Minute
mM	Millimol/l
MVB	<i>Multivesicular Bodies</i>
nm	Nanometer
NMR	Nukleare-Magnet-Resonanz

NRW	Nordrhein Westfalen
OD	optische Dichte
p.o.	<i>per os</i>
PA	<i>Protective Antigen</i>
PBS	Phosphatpuffer
Phe, F	Phenylalanin
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	Umdrehungen pro Minute
SASPs	<i>small acid-soluble proteins</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
UK	Vereinigtes Königreich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
wtPA	wild-typ PA
γ-PGA	gamma-D-Polyglutaminsäure
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

1 Einleitung

Die Milzbrandinfektion ist eine Zoonose, die vorwiegend grasende Herbivoren befällt und unter besonderen Voraussetzungen auf den Menschen übertragen werden kann. Milzbrand oder Anthrax ist eine Infektionskrankheit, die durch das grampositive, sporenbildende, bekapselte Stäbchen *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) aus der Familie der *Bacillaceae* verursacht wird.

Im Folgenden soll zunächst auf die historische Bedeutung und den klinischen Verlauf der Milzbrandinfektion eingegangen werden. Danach wird auf die Mikrobiologie des Erregers des Milzbrands *B. anthracis* näher eingegangen. Zuletzt sollen der aktuell in den USA verfügbare Impfstoff sowie aktuelle Weiterentwicklungen vorgestellt werden. Im Abschnitt Stand der Forschung sollen die Ergebnisse der Vorarbeiten kurz vorgestellt werden, die direkt zu den Fragestellungen dieser Dissertation geführt haben.

1.1 Milzbrand in der Geschichte

1.1.1 Von der Antike bis zum Mittelalter

Milzbrand bzw. die damit verbundene Erkrankung ist bereits seit der Antike bekannt und beschrieben worden. So wird z. B. die Beschreibung der Fünften Ägyptischen Plage im Buch Exodus des Alten Testaments als Milzbrandepidemie gedeutet (Schwartz, 2009). Auch eine Seuche, die in Homers Ilias beschrieben wird, kann höchstwahrscheinlich auf *B. anthracis* zurückgeführt werden (Turnbull, 2002).

Der berühmte griechische Arzt der Antike Hippokrates beschrieb als Erster im 5. Jh. vor Christus in seinen hippokratischen Schriften die kutane Milzbranderkrankung und verwendet dort bereits den Begriff „anthrakes“ für die pathognomonischen Brandbeulen (Schwartz, 2009). Der aus dem Altgriechischen stammende Begriff

„Anthrax“ bedeutet ins Deutsche übersetzt „Kohle“. Der Ursprung des deutschen Begriffs Milzbrand für die Infektion mit *B. anthracis* ist unbekannt. Er beschreibt aber sehr gut den patho-morphologischen Aspekt der Milz, wie er im Rahmen einer *B. anthracis*-Sepsis auftritt. Die Milz ist infolge der Blutfülle schwarzrot geschwollen, die Pulpa ist zerfließlich-nekrotisch, d. h. „*brandig*“ (Bankl, 2001).

Der römische Dichter Vergil beschrieb in seinem Werk *Georgica* sehr detailliert eine Anthraxepidemie und erkennt auch, dass eine Übertragung von Tier zu Mensch möglich ist (Dirckx, 1981; Sternbach, 2003). Die frühen Erkenntnisse wurden aber im Mittelalter wieder verdrängt, da die damalige Medizin von Galens Doktrin der Humoralpathologie geprägt war und der Milzbrand als Krankheit der verbrannten Galle interpretiert wurde. Eine Übertragbarkeit der Erkrankung wurde nicht erkannt, obwohl es in der Literatur zahlreiche Beschreibungen von Milzbrandepidemien über die verschiedenen Jahrhunderte gibt (Bankl, 2001).

1.1.2 Frühe Erkenntnisse

Erste Erkenntnisse bezüglich der Ätiologie entstanden aus der Beobachtung, dass der Hautmilzbrand vorwiegend in bestimmten Berufsgruppen auftritt. So waren zum Beispiel vorwiegend Abdecker, Kürschner, Gerber oder Schneider von der Erkrankung betroffen. Zu Beginn des 15. Jh. begann die maschinelle Produktion von Papier aus alten Lumpen, die nicht selten mit Milzbrandsporen verseucht waren. Auch hier kam es gehäuft zu Milzbrandinfektionen bei Papiermachern, Lumpensammlern und Buchbindern, der so genannten „Haderkrankheit“ (Hader für Lumpen, der Münchner Stadtteil Haderm bezeichnete das Gerberviertel), die allerdings für die Pest gehalten wurde (Bankl, 2001). In Wollmanufakturen führte die mit Milzbrandsporen verseuchte Wolle bei den englischen Arbeitern zu einem gehäuften Auftreten von Lungenmilzbrand, was als *wool sorter's disease* bekannt

wurde (Schwartz, 2009). Tatsächlich war Milzbrand bis zum Ende des 19. Jh. eine häufige Ursache von tödlichen Epidemien in der Nutztierhaltung. Berufsgruppen, die mit diesen Tieren zu tun hatten, litten unter einem erhöhten Risiko, sich mit dem Milzbranderreger anzustecken (Schwartz, 2009; Sternbach, 2003).

1.1.3 Die Entdeckung von *B. anthracis* als Erreger des Milzbrands

Die Übertragbarkeit der Milzbrandkrankheit wurde erstmals durch den französischen Tierarzt Barthelemy bewiesen, der 1823 Blut von milzbranderkrankten Tieren an Pferde verfütterte. Die Entdeckung von Bakterien im Blut der an Milzbrand erkrankten Tieren machten um 1850 unabhängig voneinander die Franzosen Delafond und Davaine sowie der Deutsche Landarzt Alois Pollender (Bankl, 2001). Im Gegensatz zu Delafond und Pollender entwickelte Casimir Davaine den Gedanken, dass diese Erreger tatsächlich die Ursache der Erkrankung sein könnten und veröffentlichte seine Theorie als *bactéridies charbonneuses* 1863 der wissenschaftlichen Fachwelt (Davaine, 1863). Die Experten jener Zeit zeigten sich allerdings skeptisch gegenüber dieser Theorie und Davaine wurde die Anerkennung seiner Entdeckung verweigert (Bankl, 2001).

Robert Koch wurde 1876 die Anerkennung dann zuteil, als er seine Abhandlung über „Die Ätiologie der Milzbrandkrankheit, begründet auf der Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*“ veröffentlichte (Koch, 1876). In dieser Arbeit beschreibt Koch, dass i) die Stäbchen-förmigen Mikroorganismen im Blut und Organen von milzbranderkrankten Tieren vorkommen, ii) diese in unwirtlicher Umgebung in eine Sporenform übergehen, iii) diese Sporen unter günstigen Bedingungen wieder in dieselben Stäbchen-förmigen Organismen übergehen können, iiiii) sich diese Mikroorganismen in reinen Kulturmedien anzüchten lassen und zuletzt iiiiii) eine experimentelle Übertragung sowohl von Sporen als auch angezüchteten

Mikroorganismen zur Milzbrandkrankheit in den infizierten Tieren führt (Jay, 2001; Turnbull, 2002). Diese Entdeckung wird gemeinhin als Beginn der modernen Mikrobiologie gewertet, und damit war der Milzbrand auch die erste Erkrankung, für die ein Bakterium als ätiologische Krankheitsursache postuliert und von der damaligen Fachwelt akzeptiert wurde. In seiner Schrift von 1876 verwendet Koch auch den von Ferdinand Julius Cohn 1872 vorgeschlagenen Namen *Bacillus anthracis*, den der Erreger bis zur heutigen Zeit trägt. 1881 gelang Luis Pasteur mit Hilfe seiner Kollegen Chamberland und Roux in Pouilly-le-Fort die Entwicklung eines Impfstoffes gegen *B. anthracis*. Die 25 mit einem abgeschwächten Bakterienstamm geimpften Rinder überlebten eine im Anschluss durchgeführte Injektion von Milzbrandkulturen, wohingegen die ungeimpften Kontrolltiere verstarben (Pasteur et al., 1881a, b). Durch die Entwicklung dieses Impfstoffs sowie durch die Einführung hygienischer Maßnahmen zur Seuchenprophylaxe konnte die Gefahr der natürlich auftretenden Milzbrandfälle zumindest in den Industrieländern bis zur Mitte des 20. Jh. minimiert werden (Turnbull, 2002).

1.1.4 Die Entwicklung von *B. anthracis* als Kampfstoff

Als die Gefahr durch *B. anthracis* zu Beginn des 20. Jh. gebannt schien, wurde während des Zweiten Weltkriegs die Möglichkeit die Milzbranderreger als Biowaffe zu verwenden evaluiert. Bereits 1941 wurden in Großbritannien Pläne geschmiedet, das nationalsozialistische Deutschland mit *B. anthracis* zu bekämpfen (Bankl, 2001). Auf der unbewohnten Insel Gruinard vor der Nordwestküste Schottlands wurden 1942 und 1943 erfolgreiche Versuche mit Milzbrandsporen bestückten Bomben durchgeführt (Aldhous, 1990). Alle auf der Insel ausgesetzten Schafe verendeten nach der Exposition mit den Sporen. Allerdings verzögerte sich die Produktion dieser Bomben bis Mitte 1945 und machte den Einsatz über dem bereits kapitulierten

Deutschland hinfällig. Auf der Insel Gruinard konnten auch 1979 noch Milzbrandsporen nachgewiesen werden (Manchee et al., 1981). Nach mehreren Unternehmungen zur Desinfektion wurde Gruinard 1988 als dekontaminiert beurteilt und am 1. Mai 1990 an den ursprünglichen Besitzer der Insel zurückgegeben (Aldhous, 1990; Manchee et al., 1983).

Ein anderes einschneidendes Ereignis in der Geschichte der Milzbrand-Biowaffe war die Milzbrandepidemie von 1979, bei der durch versehentlich freigesetzte Milzbrandsporen aus einer militärischen Forschungseinrichtung in Jekaterinburg (ehemals Swerdlowsk) 64 von insgesamt 96 infizierten Patienten an den Folgen einer Milzbrandinfektion starben. Wie sich durch unabhängige Untersuchungen erst 1993 herausstellen sollte (Abramova et al., 1993; Meselson et al., 1994), verliefen die Milzbrandinfektionen zum größten Teil als Lungenmilzbrand. Wissenschaftlich interessant ist diese Epidemie vor allem, weil es bis heute der einzige systematisch untersuchte Ausbruch von Lungenmilzbrand beim Menschen ist. Die heutigen Erkenntnisse über klinischen Verlauf des Lungenmilzbrands wie z. B. Inkubationszeit, Zeit bis zum Eintritt des Todes, etc. beruhen in erster Linie auf den Untersuchungen der Milzbrandepidemie von Swerdlowsk (Dixon et al., 1999).

1.1.5 *B. anthracis* und die Bedrohung des Bioterrorismus

Nicht zuletzt aufgrund der Ereignisse in Swerdlowsk und dem Ersten Golf-Krieg 1991, bei dem von US-Militärstrategen befürchtet und öffentlichkeitswirksam propagiert wurde, dass von Seiten des Irak Biowaffen in großem Umfang zum Einsatz kommen könnten, wurde die Erforschung von *B. anthracis* v.a. in den USA weiter vorangetrieben. In der zivilen Forschung spielte Milzbrand allerdings über viele Jahre keine wichtige Rolle, da natürliche Fälle von Milzbrandinfektionen in den Industrienationen in der zweiten Hälfte des 20. Jh. nur noch äußerst sporadisch

auftraten (Turnbull, 2002). Dies änderte sich 2001, als in der Folge der Anschläge vom 11. September 2001 die Bedrohung durch terroristische Anschläge in den USA und der restlichen Welt zum Mittelpunkt der Berichterstattung wurde und die Gefahr des Bioterrorismus eine große Aufmerksamkeitssteigerung in den Medien bekam. Tatsächlich kam es im Oktober und November 2001 zu insgesamt 22 Fällen von Milzbrandinfektionen in den USA, von denen fünf Patienten an den Folgen verstarben (Borio et al., 2001; Bush et al., 2001; CDC, 2001b). Wie sich später herausstellen sollte, gingen die Attacken von einem amerikanischen Forscher aus, der Zugang zu pathogenen *B. anthracis* Stämmen im Rahmen seiner Forschungsarbeiten an einer militärischen Einrichtung hatte (Dance, 2008; Enserink and Bhattacharjee, 2008). Die Folge war dennoch ein enormes Interesse der amerikanischen Öffentlichkeit an Milzbrand und die US-Regierung erhöhte die Ausgaben für die Erforschung von Erregern, die wie *B. anthracis* als Biowaffe verwendet werden können immens. Hierdurch kam es zu einem enormen Wissenszuwachs über *B. anthracis* und einer starken Zunahme der Publikationen zum Thema Milzbrand (Schwartz, 2009).

1.2 Klinischer Verlauf der Milzbrandinfektion

1.2.1 Hautmilzbrand

Die Milzbrandinfektion beim Menschen kann sich in vier verschiedenen Formen manifestieren. Bei der natürlich vorkommenden Milzbranderkrankung ist mit über 95% der Hautmilzbrand die häufigste Verlaufsform (Dixon et al., 1999; Swartz, 2001). Dieser manifestiert sich häufig an bereits durch Schnitte oder Schürfwunden verletzten Stellen der Haut im Bereich des Gesichts, des Nackens, der Arme oder Hände. An der Stelle des Eindringens der Sporen entsteht eine rasch fortschreitende, umschriebene Entzündung in Form einer Papel mit Rötung und

Schwellung des umliegenden Gewebes. Hieraus entwickelt sich innerhalb von 2-6 Tagen ein mit schwärzlichem Schorf bedecktes, nicht-schmerzhaftes Geschwür, das so genannte Milzbrandkarbunkel (*pustula maligna*). Als Komplikation des Hautmilzbrands kann es zu einer Ausbreitung der lokalen Infektion mit begleitender Lymphadenitis bis hin zur Bakteriämie und Sepsis kommen. Unbehandelt verläuft der Hautmilzbrand in 5-20% tödlich (Quinn and Turnbull, 1998).

1.2.2 Lungenmilzbrand

Beim Lungenmilzbrand (inhalativer Anthrax) erfolgt die Ansteckung über die Atemwege. Nach Inhalation der Endosporen, die in Partikeln mit $<5\ \mu\text{m}$ Durchmesser problemlos in die Alveolen vordringen können (Druett et al., 1953), werden diese von alveolären Makrophagen phagozytiert und zu den hilären Lymphknoten transportiert (Sweeney et al., 2011). Obwohl die Alveolen den Ort des ersten Kontaktes darstellen, präsentiert sich der Lungenmilzbrand nicht als klassische Pneumonie und zeigt in der Regel auch keine alveoläre Entzündung. Vielmehr reifen die von Makrophagen eingeschlossenen Sporen auf ihrem Weg zum Lymphknoten zu vollständig pathogenen Milzbrandbakterien, die sich dort angekommen auch rasch vermehren. Dies führt zu dem Bild einer hämorrhagischen Mediastinitis mit einer im Röntgenbild des Thorax typischen Verbreiterung des Mediastinums. Die Inkubationszeit beträgt im Mittel ca. 7 Tage von der Exposition mit Sporen zu dem ersten Auftreten von Krankheitssymptomen. Allerdings wurde in einzelnen Berichten auch eine Latenz von bis zu 6 Wochen beschrieben, was als Ausdruck der ausgesprochenen Resistenz und Persistenz von Anthraxsporen im menschlichen Körper gewertet wurde (Meselson et al., 1994). Die initialen klinischen Symptome sind zunächst uncharakteristische, grippale Beschwerden, wie Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen sowie unproduktiver Husten, was differentialdiagnostische

Schwierigkeiten bereitet (CDC, 2001a). Nach Beginn der Symptomatik tritt dann mit sehr kurzer Latenz von zwei bis vier Tagen ein schweres Krankheitsbild mit hohem Fieber, respiratorischer Insuffizienz und Sepsis ein, das auch unter intensivmedizinischer und antibiotischer Behandlung fast immer tödlich verläuft. Nur eine frühzeitige antibiotische Therapie, die bei Beginn der unspezifischen Symptomatik verabreicht wird, kann in der Regel einen fulminanten und letalen Verlauf der Krankheit abwenden (Dixon et al., 1999).

1.2.3 Darmmilzbrand

Darmmilzbrand, oder besser Anthrax des Verdauungstraktes, kann in gastrointestinalen und oropharyngealen Milzbrand unterteilt werden (Swartz, 2001). Gemeinsam ist beiden Krankheitsbildern der Eintritt von Milzbrandsporen durch das Verzehren von kontaminiertem Fleisch von an Milzbrand verendeten Tieren. In Mitteleuropa und den USA ist dieses Krankheitsbild beim Menschen extrem selten. Dennoch wird vor allem in Entwicklungsländern immer wieder ein endemisches Auftreten von Darmmilzbrand beschrieben (Kanafani et al., 2003; Sirisanthana and Brown, 2002). Es wird vermutet, dass die Inzidenz aufgrund der medizinischen Unterversorgung der betroffenen Länder häufig unterschätzt wird. Die ersten Symptome treten zwei bis fünf Tage nach dem Verzehr von sporenhaltigem Fleisch auf und umfassen Übelkeit, Erbrechen, Fieber und Bauchschmerzen. Der weitere Verlauf ist rapide und präsentiert sich mit dem Bild eines akuten Abdomens mit blutigen Diarrhoen. Analog zum Hautmilzbrand kommt es zu Ulzerationen des GI-Traktes, die von Hämatemesis begleitet sein können. Weiterhin kann es zu einer hämorrhagischen, mesenterischen Lymphadenitis mit begleitendem Aszites kommen. Auch hier ist die Letalität unbehandelt relativ hoch und eine frühe

antibiotische Therapie von entscheidender Bedeutung für die Prognose (Dixon et al., 1999).

1.2.4 Milzbrand-Meningitis

In seltenen Fällen einer systemischen Milzbrandinfektion kann es zu einer septischen Streuung von Milzbrandernregern in das ZNS kommen. Hier präsentiert sich die Infektion mit dem Bild einer hämorrhagischen Meningitis, die fast zu 100% letal verläuft (Rangel and Gonzalez, 1975; Tabatabaie and Syadati, 1993).

1.3 Milzbrand in Deutschland

Am 18.12.2009 wurde bekannt, dass ein 42-jähriger Heroinabhängiger an den Folgen einer kutanen Milzbrandinfektion in einem Krankenhaus in Nordrhein-Westfalen verstorben ist. Die Infektion trat vermutlich durch eine i.v.-Injektion von kontaminiertem Heroin in die Kniekehle des Patienten auf. An dieser Stelle zeigten sich auch die für den Hautmilzbrand typischen Merkmale (RKI, 2010b). Ein weiterer Fall von Milzbrand bei einem Heroinabhängigen trat im März 2010 ebenfalls in NRW auf (Bernard et al., 2010). In Zusammenhang mit einem i.v.-Drogenabusus kam es zuletzt in Schottland zu 33 Fällen von Hautmilzbrand bei Drogenkonsumenten, von denen elf tödlich verliefen (RKI, 2010a). Die Fälle in NRW stellen die erste Infektion mit *B. anthracis* seit 1994 und den ersten Todesfall seit 1975 (Darmmilzbrand) in Deutschland dar (RKI, 2000, 2010b). Dennoch stellt die natürliche Milzbrandinfektion in den Industrieländern heute praktisch keine Gefahr mehr dar. In Deutschland ist daher aktuell auch kein Impfstoff gegen Milzbrand für die Verwendung beim Menschen verfügbar. Als potenziell gefährdete Berufsgruppen gelten Personen, die in der tierproduktverarbeitenden Industrie tätig sind sowie Beschäftigte im Bereich der Tiermedizin, der Land-, Jagd- und Forstwirtschaft. Hier wird bei Verdacht auf

Exposition von Milzbrandsporen eine postexpositionelle Chemoprophylaxe mit z. B. Ciprofloxacin 2x500 mg für bis zu 60 Tage empfohlen (RKI, 2003).

1.4 *Bacillus anthracis*

B. anthracis ist ein grampositives, unbewegliches, aerobes, fakultativ anaerobes, bekapseltes Stäbchen, das in der Lage ist, äußerst widerstandsfähige Sporen zu bilden (RKI, 2003). Es gehört zu der Gattung *Bacillus* aus der Familie der *Bacillaceae* und bildet zusammen mit fünf weiteren verwandten Arten (*B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*) die *B. cereus* Gruppe (*B. cereus sensu lato*) (Kolsto et al., 2009). Gemeinsam ist der *B. cereus*-Gruppe die Bildung von Endosporen unter unwirtlichen Bedingungen, die extreme Resistenz gegenüber Hitze, UV-Strahlung, Austrocknung und Desinfektionsmitteln aufweisen. *B. anthracis* selbst ist eine höchst monomorphe Art mit geringer genetischer Variation in den einzelnen Unterarten. Charakteristisch ist das Vorhandensein von zwei Plasmiden pXO1 und pXO2, den so genannten Virulenzplasmiden, die die genetische Information für die Pathogenitätsfaktoren von *B. anthracis* tragen. Diese kodieren das Toxin (pXO1) sowie die Kapselbildung (pXO2) und sind beide zusammen für die volle Pathogenität von *B. anthracis* notwendig. Stämme, die einen oder beide Plasmide verloren haben, verursachen in der Regel keine tödlichen Infektionen. Allerdings ist der Verlust von pXO2 deutlich häufiger und tritt auch spontan in der Natur auf (Turnbull et al., 1992).

1.4.1 Morphologie

Das vegetative *B. anthracis* ist ein kastenförmiges Stäbchen von 1-1,5 µm Breite und 5-8 µm Länge. In Ausstrichen aus infiziertem Blut liegen die Stäbchen einzeln oder in kurzen Ketten mit ihrer typischen Polypeptid-Kapsel vor, die sich mit Methylenblau (M'Fadyean Reaktion) anfärben (M'Fadyean, 1903; World Health Organization,

2008) oder mit *India Ink* mikroskopisch darstellen lässt (Koehler, 2009). In Ausstrichen von Kulturen auf Agar-Platten oder flüssigen Nährmedien präsentiert sich *B. anthracis* in sehr langen Ketten von Stäbchen ohne die Ausbildung einer Kapsel, sofern nicht ganz spezielle Inkubationsbedingungen vorliegen (Vorhandensein von Bicarbonat, 5-20% CO₂, 50% Serum in flüssigen Nährmedien) (Ezzell and Welkos, 1999; Sterne, 1937a).

Die Kultivierung von *B. anthracis* ist problemlos möglich, da der Erreger nur geringe Ansprüche an das Kulturmedium stellt. Auf Blutagar bilden die Bakterien grau-weißliche Kolonien von 2-4 mm Durchmesser, die nicht-hämolytisch sind. Die matt glänzenden Kolonien haben „lockige“ Ausläufer (so genanntes Medusenhaupt) und sind in der Mitte erhaben. Dies ist jedoch nicht spezifisch für *B. anthracis*, da auch andere *Bacilli* eine ähnliche Morphologie aufweisen. Bestätigt wird die Identität durch die Lyse durch Gammaphagen, die Empfindlichkeit gegenüber Penicillin sowie das Ausbilden der Kapsel unter den oben beschriebenen Bedingungen (Turnbull, 2002). Heute stellt die PCR den Goldstandard in der Identifikation des *B. anthracis* dar. Das komplette Genom sowie beide Plasmide sind seit 2001 sequenziert. Die PCR hilft v. a. bei der Schnell Diagnostik und Differenzierung von Stämmen, die z. B. das pXO2 Plasmid verloren haben und daher keine Kapsel bilden (Mock and Fouet, 2001).

1.4.2 Kapsel und S-Layer

Neben der für fast alle Bakterien typischen zytoplasmatischen Membran und der Peptidoglykan-Schicht (Murein-Wand), die bei *B. anthracis* als grampositives Bakterium 20-50 nm dick ist, besitzt es noch zwei weitere Hüllschichten: Kapsel und S-Layer. Diese besondere Architektur ist sehr komplex und nur wenige Bakterien besitzen diese beiden Strukturen zusammen.

Die Kapsel wurde 1903 von M'Fadyean unter dem Mikroskop beschrieben und angefärbt (M'Fadyean, 1903) und bald darauf wurde sie als Pathogenitätsfaktor erkannt (Preis, 1909). Im Gegensatz zu vielen anderen Bakterienkapseln, die aus Polysacchariden bestehen, ist die Kapsel von *B. anthracis* aus Polypeptiden einer einzigen Aminosäure, nämlich γ -D-Glutaminsäure, aufgebaut. Diese Polypeptide sind Ketten von 20-55 kDa bei *B. anthracis in vitro* und werden auf eine Größe von 215 kDa *in vivo* geschätzt (Zwartouw and Smith, 1956). Die Bildung einer solchen Polypeptidkapsel ist sehr selten bei Bakterien. Es gibt aber ein paar Arten der Gattung *Bacillus* (wie z. B. *B. licheniformis*), die ebenfalls eine solche Kapsel synthetisieren. Im Gegensatz zu *B. anthracis*, bei dem das Polymer nur membranständig als Kapsel vorkommt, können diese Arten auch γ -D-Polyglutaminsäure in das Medium sezernieren (Birrer et al., 1994; König and Niemetz, 1997).

Die Kapsel aus γ -D-Polyglutaminsäure ist wenig immunogen, d. h. sie induziert keine humorale Abwehrreaktion beim infizierten Wirt, spielt aber eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Milzbrandinfektion. Durch die Kapsel, die eine Phagozytose durch Makrophagen verhindert, entgeht *B. anthracis* der Immunantwort des Wirtes und kann sich so relativ ungehindert vermehren und eine septische Streuung auslösen (Ezzell and Welkos, 1999). Wie bereits erwähnt, ist die Information für die Kapselbildung auf dem Plasmid pXO2 codiert. Heute geht man von fünf Genen auf dem pXO2 Plasmid aus, die für die Kapselbildung notwendig sind. CapB, CapC, CapA und CapE sind Membranproteine, die wahrscheinlich einen gemeinsamen Komplex bilden. CapD codiert eine γ -Glutamin-Transpeptidase, die sowohl PGA hydrolysieren kann als auch für die kovalente Bindung von PGA an die Peptidoglykan-Zellwand notwendig ist (Fouet, 2009). Obwohl pXO1 nicht für die Kapselbildung von *B. anthracis* notwendig ist, sind pXO1⁻ Stämme deutlich weniger

bekapselt. Dies liegt an der Abwesenheit des AtxA-Regulatorgens auf dem pXO1 Plasmid, das unter anderem die Expression von CapABCDE reguliert (Fouet and Mock, 2006; Koehler, 2002).

Die genaue Funktion der S-Layer, die eine vierte Schicht an der Außenseite der Zellwand von *B. anthracis* bildet, ist bis heute ungeklärt. Auf dem Anthrax-Genom werden die beiden S-Layer Proteine Sap und EA1 codiert, die allerdings keinen direkten Einfluss auf die Pathogenität von *B. anthracis* zu haben scheinen (Fouet, 2009).

1.4.3 Das Toxin

Neben der Kapsel ist das Exotoxin von *B. anthracis* die Hauptursache für die Pathogenität des Erregers. Erstmals wurden das Anthrax-Toxin in den 1950er Jahren von Smith und Keppie isoliert und seine Wirkung *in vivo* und *in vitro* untersucht. Dabei entdeckten sie, dass das Anthrax-Toxin aus unterschiedlichen Proteinkomponenten zusammen gesetzt ist (Smith et al., 1953). Es gehört zu der Familie der so genannten „binären Toxine“. Diese binären Toxine bestehen zum einen aus einer enzymatisch/toxischen wirksamen Komponente, der so genannten A Domäne und zum anderen aus der B Domäne, die die Bindung an den Rezeptor der Wirtszelle und das Einschleusen der A Domäne in das Zytoplasma der Wirtszelle vermittelt. Das A-B-Toxin Protein wird vom Plasmid pXO1 kodiert. Nach Sekretion bildet das Anthrax-Toxin ein Trimer (Young and Collier, 2007). Die als *Lethal Factor* (LF) und *Edema Factor* (EF) bezeichneten Toxine entsprechen der A Domäne und die als *Protective Antigen* (PA) bezeichnete Domäne ist die B Domäne. LF ist eine 90 kDa große Zinkprotease, die spezifisch *Mitogen-activated protein kinase kinases* (MAPKK) spaltet und inaktiviert (Duesbery et al., 1998; Vitale et al., 1998). Das zweite Enzym EF ist eine 89 kDa große Calcium- und Calmodulinabhängige

Adenylatzyklase (AC) (Leppla, 1982). PA ist ein 83 kDa großes Protein, das als Transportvehikel für EF und LF ins Zytosol fungiert. Der Name *Protective Antigen* wurde gewählt, da dieses Protein als Teil eines Impfstoffs schützende Antikörper gegen eine Milzbrandinfektion induzieren kann (Gladstone, 1954; Lacy and Collier, 2002).

Der Wirkmechanismus des Antrax-Toxins auf zellulärer Ebene soll im Folgenden kurz umrissen werden und ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Zuerst bindet PA₈₃ an einen der beiden bekannten Rezeptoren ANTXR1 und ANTXR2 auf der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Dort spaltet eine Protease der Furin-Familie eine 20 kDa große Untereinheit (PA₂₀) am N-Terminus des PA ab und hinterlässt die am Rezeptor gebundene C-terminale Untereinheit PA₆₃. Diese Untereinheit bildet im Folgenden mit sechs weiteren, an Rezeptoren gebundenen PA₆₃ Einheiten einen ringförmigen Heptamerkomplex, die so genannte Prä-Pore. Dieses Heptamer kann nun selbst bis zu drei Moleküle EF und/oder LF kompetitiv binden (Cunningham et al., 2002; Mogridge et al., 2002). Der so entstandene Komplex wird über Liganden-induzierte Endozytose (d. h. die Endozytose wird erst durch binden von PA an ANTXR1 oder ANTXR2 induziert) in das endosomale Kompartiment transportiert. Die Endozytose ist Clathrin-vermittelt und benötigt Actin und Dynamin (Abrami et al., 2010). Die Rolle des *lipoprotein-receptor-related protein 6* (LRP6) für die Endozytose des Toxins ist nicht sicher geklärt; LRP6 scheint aber zumindest als Co-Faktor involviert zu sein, ohne dass jedoch ein absolutes Vorhandensein für die Endozytose des Toxins notwendig wäre (van der Goot and Young, 2009). Nach der Clathrin-vermittelten Endozytose werden die so entstandenen Endosomen durch den so genannten *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT) in frühe Endosome überführt. Für diesen Prozess spielt die Rezeptor-Ubiquitinierung und der zytosolische Abschnitt der transmembranösen Anthrax-Rezeptoren eine

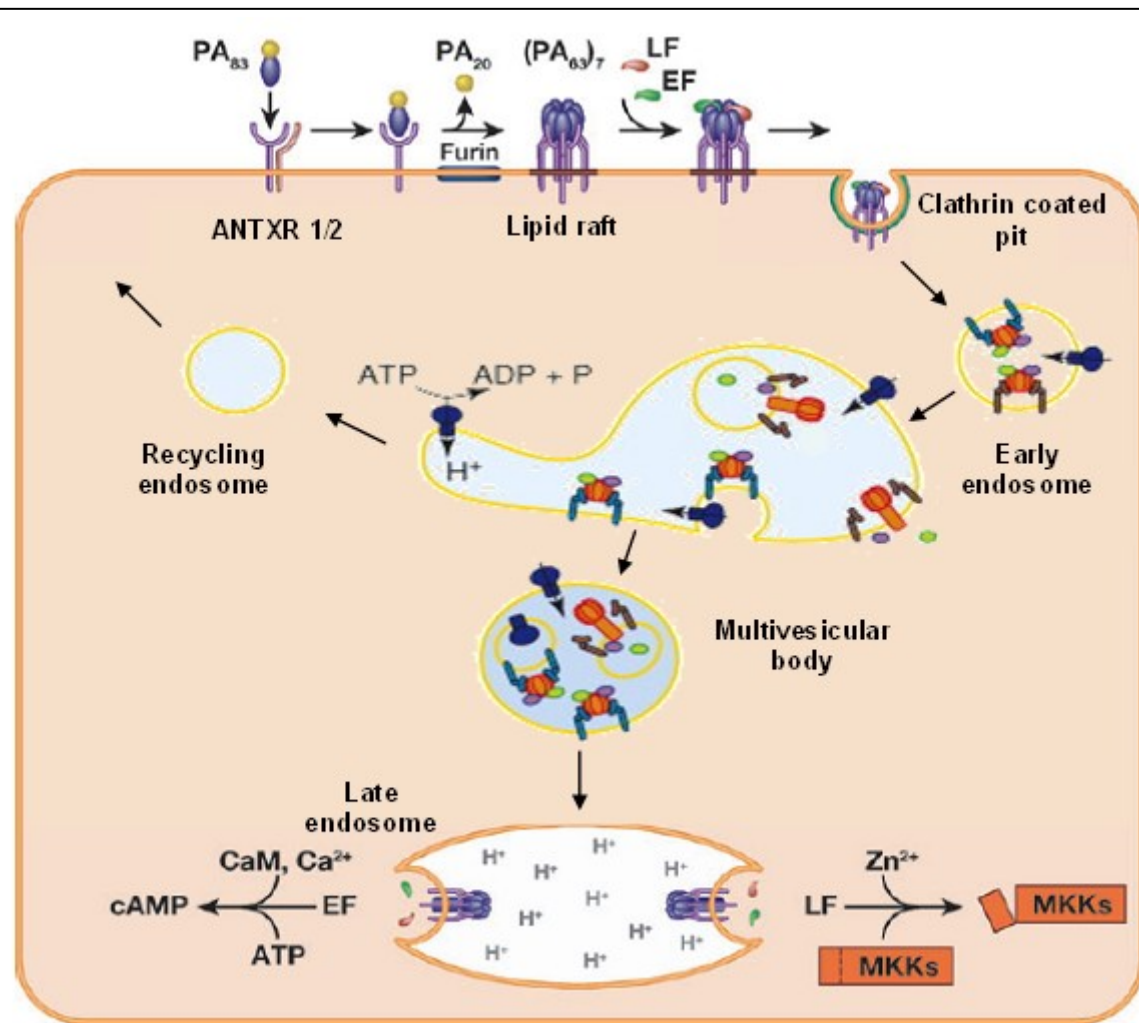


Abbildung 1: Darstellung des zellulären Mechanismus der Milzbrand-intoxikation (modifiziert nach Collier und Young 2003 sowie Puhar und Montecucco 2007)

- 1) Bindung von PA_{83} an den membrangebundenen Rezeptor
- 2) Abspaltung von PA_{20} durch eine Furinproteinase
- 3) Heptamerisierung von rezeptorgebundenen PA_{63} Molekülen
- 4) Bindung von 3 Molekülen EF und/oder LF
- 5) Clathrin-abhängige Endozytose des PA-EF/LF Toxinkomplexes
- 6) Einschleusung der Vesikel in das frühe endosomale Kompartiment mittels ESCRT/ Entstehung von frühen Endosomen
- 7) Endosomal Transport in das späte Kompartiment
- 8) Bildung einer Pore durch das PA-Heptamer und Transport von EF/LF in das Zytosol (vorwiegend im späten Endosom)

entscheidende Rolle (Abrami et al., 2006; Abrami et al., 2004). Über den endosomalen Transportweg gelangt das Toxin vom frühen endosomalen Kompartiment (frühe Endosomen) über so genannte *multivesicular bodies* (MVB) in das späte endosomale Kompartiment (späte Endosomen). Hierbei macht sich das Toxin den zelleigenen endosomalen Transport zu nutzen (Abrami et al., 2004; Puhar and Montecucco, 2007). Auf dem Weg vom frühen zum späten endosomalen Kompartiment fällt der intraluminale pH-Wert kontinuierlich ab, was eine Rezeptor-dissoziation der PA-Heptamere begünstigt und durch Konformationsänderungen der Prä-Pore in der Endosomenmembran die Translokation von EF und LF in das Zytosol ermöglicht. Es scheint als sei die Translokation von EF und LF in das Zytosol auf jeder Stufe des endosomalen Transports möglich, findet aber bevorzugt auf der Ebene der späten Endosomen statt (Puhar and Montecucco, 2007; Zorretta et al., 2010). Autophagozytose durch Lysosomen scheint zumindest für ANTXR2 auf der Ebene der späten Endosomen eine Rolle bei der Translokation von LF in das Zytosol zu spielen (Ha et al., 2010). Um durch die Pore zu gelangen, untergehen EF und LF mehrere Konformationsänderungen, weshalb sie sich nach der Translokation ins Zytosol, bevor sie ihre enzymatische Wirkung in der Wirtszelle aufnehmen können, zunächst wieder in die aktive Form zurückfalten müssen (Young and Collier, 2007). Der genaue Ablauf der Toxin-Endozytose und der Freisetzung von EF und LF in das Zytosol ist nicht vollständig geklärt und Gegenstand anhaltender wissenschaftlicher Arbeit. Obwohl die Forschungsergebnisse der letzten Jahre das Verständnis der intrazellulären Abläufe der Anthrax-Intoxikation deutlich verbessert haben, gibt es auch einige konträre Ergebnisse. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Abläufe für die beiden unterschiedlichen Rezeptoren ANTXR1 und ANTXR2 nicht identisch sind. ANTXR2 hat eine ca. 1000-fach höhere Affinität für PA und die

Anforderungen an den pH zur Rezeptordissoziation und die Porenbildung sind ebenfalls unterschiedlich (van der Goot and Young, 2009).

Die Kombination aus PA mit EF bildet das *Edema Toxin* (EdTx) und analog dazu geht aus der Bindung von LF an PA das *Lethal Toxin* (LeTx) hervor. Experimentell lassen sich diese beiden Komponenten unabhängig voneinander untersuchen, wenn isolierte Toxinpräparationen verwendet werden (Friedlander, 1986). Alternativ kann auch jedes der zwei Toxingene (EF, LF) durch Deletion inaktiviert werden und somit eine Intoxikation mit LeTx oder EdTx isoliert untersucht werden. Pathophysiologisch lässt sich die Milzbrandintoxikation allerdings nicht in die einzelnen Toxine unterteilen, da im Rahmen einer Milzbrandinfektion normalerweise beide Toxine gleichzeitig in einer Zelle vorliegen. Ein PA Heptamer kann gleichzeitig EF und LF binden und in das Zytosol der Wirtszelle schleusen (Young and Collier, 2007). Hierdurch ergeben sich Synergismen der beiden Enzymaktivitäten *in vivo*, wodurch die Pathogenität der einzelnen Toxine noch verstärkt wird (Quesnel-Hellmann et al., 2006; Stanley and Smith, 1961).

1.4.3.1 Protective Antigen

Die kristallographische Darstellung des PA₈₃ zeigt ein 2,1 Å großes Protein, das aus vier verschiedenen Faltungs-Domänen besteht (Petosa et al., 1997). Domäne 1 hat eine β -*Sandwich* Struktur und beinhaltet die Stelle, an der PA₈₃ durch die Furin-Protease gespalten wird (Klimpel et al., 1992; Molloy et al., 1992). Hierdurch wird die Domäne 1 in die Unterdomänen 1a (PA₂₀) und 1b, die jetzt das N-terminale Ende des PA₆₃ Moleküls bildet, gespalten. Die Abspaltung von PA₂₀ stellt einen kritischen Schritt in der Wirkweise des Milzbrandtoxins dar, da PA₈₃ nicht oligomerisieren kann und die freigelegten Anteile der Domäne 1b die Bindungsstelle für EF und LF beinhalten (Lacy and Collier, 2002).

Domäne 2 hat eine β -Barrel Struktur und ist maßgeblich für die Bildung der Pore verantwortlich (Petosa et al., 1997). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Domäne 2 auch an der Rezeptorbindung von PA₈₃ beteiligt ist (Lacy et al., 2004b; Santelli et al., 2004). Im oligomerisierten Zustand als Heptamer kommt es bei Domäne 2 unter dem Einfluss des niedrigen pH zu einer großen Konformationsänderung, die zu einer 14-strängigen β -Barrel Membrantransportpore führt. Die 2 β 2-2 β 3 Schleife von Domäne 2 bildet den transmembranösen Anteil der β -Barrel (Benson et al., 1998; Qa'dan et al., 2005).

Domäne 3 ist die kleinste der vier Domänen und ist für die Heptamerbildung notwendig (Lacy et al., 2004a). Mutationen in dieser Domäne verhindern die Oligomerisation, bei der sich Domäne 3 an eine Anschlussstelle in Domäne 1b des Nachbarmoleküls einhängt (Mogridge et al., 2002).

Domäne 4 besteht aus einem β -Sandwich und hat eine Immunglobulin-ähnliche Faltung. Sie ist in erster Linie an der Rezeptorbindung von PA beteiligt und hat relativ wenig Kontakt zu den restlichen Domänen (Rosovitz et al., 2003; Singh et al., 1991).

In der Heptamerform, die die Prä-Pore bildet, sind die einzelnen PA₆₃ Moleküle wie „Kuchenstücke“ angeordnet. Im Vergleich zur monomeren Struktur von PA₈₃ wird die Konformation von PA₆₃ durch die Oligomerisation kaum verändert. Dabei zeigen die Domänen 1b und 2 nach innen, die Domänen 3 und 4 sind nach außen gerichtet (Young and Collier, 2007). Die nach innen gerichteten Anteile der Domänen 1b und 2 bestehen hauptsächlich aus polaren und negativ geladenen Aminosäuren. Die Ausnahme bildet das sich im Lumen der Pore befindliche Phenylalanin an Stelle 427 (Phe427) der Domäne 2, das eine entscheidende Rolle bei der Translokation von EF und LF ins Plasma spielt (Krantz et al., 2005).

Heute kennt man zwei verwandte Rezeptoren, die beide PA₈₃ auf der Oberfläche der Wirtszelle binden und die Wirkung des Milzbrandtoxins vermitteln. Diese heißen

ANTXR1 (*anthrax toxin receptor 1* oder *tumor endothelial marker-8*) und ANTXR2 (*anthrax toxin receptor 2* oder *capillary morphogenesis protein 2*) (Bradley et al., 2001; Scobie et al., 2003). Alternatives mRNA *Splicing* lässt jeweils drei verschiedene Isoformen entstehen, wobei PA₈₃ jeweils nur an die lange (564 Aminosäuren) und mittellange (368) Isoform von ANTXR1 sowie die beiden langen (489 und 488) Isoformen von ANTXR2 bindet (Liu and Leppla, 2003; Rainey et al., 2005). Die Rezeptoren sind Typ 1 Membranproteine. Die extrazelluläre Bindungsdomäne ist verwandt mit dem *von Willebrand* Faktor Typ A (VWA) und den *integrin inserted (I) domains*. Der zytoplasmatische Anteil dieser Rezeptoren scheint hingegen keinen Anteil an dem Wirkmechanismus des Anthrax-Toxins zu haben, da eine Deletion dieser Anteile zu keinem Wirkverlust des Milzbrandtoxins führt (Liu and Leppla, 2003).

1.4.3.2 Lethal Factor

LF und EF haben einen identischen N-Terminus über den beide Enzyme die gleiche Bindungsstelle am PA₆₃ benutzen (Pimental et al., 2004). Der C-terminale Anteil von LF entspricht der enzymatisch aktiven Zink-Metalloprotease-Komponente. Diese MAPKK spaltet und aktiviert spezifisch die Stresskinasen ERK1/2, JNK/SAPK und p38, die wiederum zahlreiche Funktionen im Bereich der Proliferation, Zellzyklusregulation, Immunmodulation und Apoptose regulieren (Moayeri and Leppla, 2009). Klinisch äußert sich die Intoxikation mit LeTx durch einen atypischen, vaskulären Schock ohne die unter einem Endotoxinschock typischen Zeichen wie Thrombose und Zytokinausschüttung (Cui et al., 2004). Die Empfindlichkeit auf LeTx variiert sehr stark in verschiedenen Spezies und innerhalb von Spezies von Stamm zu Stamm (Moayeri and Leppla, 2009). So sterben z. B. empfindliche Rattenstämme wie die Fischer-Ratte innerhalb von 60 min nach Injektion mit LeTx (Gupta et al.,

2008), wohingegen Mäuse über 2-6 Tage langsam verenden. Histopathologisch finden sich kaum oder keine Zeichen einer Schocksymptomatik. Der genaue Mechanismus der Intoxikation *in vivo* ist bis heute unbekannt (Moayeri and Leppla, 2009; Tonello and Montecucco, 2009). Obwohl LeTx in einigen Mausstämmen besonders toxisch für Makrophagen ist und man früher annahm, dass die Lyse und Zerstörung dieser Zellen zu einer verstärkten Zytokinausschüttung führt, die konsekutiv die Schockpathogenese erklärt (Hanna et al., 1993), ist man heute wieder von diesem Modell abgekommen. Dies liegt vor allem daran, dass auch Mausstämme mit LeTx resistenten Makrophagen derselben Schocksymptomatik unterliegen (Moayeri et al., 2003). Darüber hinaus spielt gerade die im Mausmodell untersuchte Lyse von Makrophagen bei der LeTx-Intoxikation beim Menschen kaum eine Rolle, da menschliche Makrophagen resistent gegen LeTx induzierte Lyse sind. Dennoch scheint auch beim Menschen die Toxinwirkung auf Makrophagen und andere Zellen des Immunsystems eine wichtige Rolle zu spielen (Tournier et al., 2009a). So wirkt LeTx gezielt gegen die bakterizide Aktivität von Makrophagen (Bozue et al., 2005; Welkos et al., 2002), verhindert Chemotaxis durch verminderte Makrophagenbeweglichkeit (Rossi Paccani et al., 2007) und induziert über die Hemmung des p38 α -Signalweges Apoptose in diesen Zellen (Park et al., 2002). Darüber hinaus beeinträchtigt LeTx zusammen mit EdTx die Funktion von Dendritischen Zellen (Agrawal et al., 2003) und dadurch eine adäquate zelluläre und humorale Immunantwort durch T- bzw. B-Zellen (Fang et al., 2005; Fang et al., 2006).

1.4.3.3 Edema Factor

Wie bei LF, entspricht die C-terminale Domäne des EF einer enzymatischen Komponente. In diesem Fall ist es eine calciumabhängige Adenylatzyklase (AC), die

zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP führt. EF ist zunächst inaktiv und benötigt für seine AC-Aktivität die Bindung von Calmodulin (CaM) an das Protein. AC-Aktivität haben auch andere Toxine wie CyaA von *Bordetella pertussis*. CyaA ist ebenfalls CaM-abhängig und die intrazellulären Mechanismen von EF und CyaA scheinen sehr ähnlich abzulaufen (Tang and Guo, 2009). Der prominenteste klinische Effekt ist die Entwicklung eines Ödems im Bereich der Infektionsstelle mit Milzbrandsporen oder der Injektionsstelle von isoliertem EdTx. Ebenfalls kann die Gabe von EdTx zu Herzversagen, ausgedehnten Gewebeschäden und letzten Endes auch zum Tod führen (Firoved et al., 2005; Kuo et al., 2008). Darüber hinaus inhibiert EdTx die Immunreaktion während einer Milzbrandinfektion durch Beeinträchtigung der Makrophagenaktivität (Szarowicz et al., 2009), Zytokinausschüttung (Hong et al., 2007; Rossi Paccani et al., 2007) sowie der Antigenpräsentation (Paccani et al., 2005). EdTx alleine ist im Vergleich zu LeTx nur in sehr hoher Dosis tödlich, allerdings erhöht EdTx die Pathogenität von LeTx und *vice versa* (Firoved et al., 2007; Tournier et al., 2005).

1.4.4 Die Anthrax Spore

Der natürliche Infektionsweg des Milzbranderreger verläuft über die Sporenform des *B. anthracis*. Diese bilden sich als Endosporen aus der vegetativen Form, wenn das Nahrungsangebot in der Umgebung schlecht ist und dienen dem Überleben als Ruheform (Driks, 2009). Die Sporen sind äußerst widerstandsfähig und können über Jahrzehnte im Erdreich überleben. Die Sporenbildung dient neben dem Überleben des *Bacillus* auch der Verteilung des Erregers über verschiedene Milieus wie Wasser, Erdreich und Wirtstiere (World Health Organization, 2008).

Der Infektionszyklus beginnt mit der Aufnahme der Sporen in den Körper, wo der Reifungsprozess zur vegetativen Form beginnt. Dieser Prozess, der in etwa acht

Stunden dauert, ist für *B. subtilis* sehr genau beschrieben. Man geht davon aus, dass dieser für *B. anthracis* sehr ähnlich verläuft (Errington, 2003; Giorno et al., 2007). Der genaue zelluläre Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt. Man weiß allerdings, dass eine Reihe von Faktoren wie Verfügbarkeit von Nahrung, Phase des Zellzyklus und Zytokine im Medium darauf Einfluss nehmen (Grossman, 1995; Hoch, 1993). Die Reifung wird durch Aminosäuren, Ribonukleoside und Peptidoglykanfragmente getriggert, Substanzen, für die es spezifische Rezeptoren an der inneren Sporenmembran gibt. Diese Triggerung führt zu einem Wassereinstrom in den Kern und einem Aufbrechen der Hüllschichten gefolgt von metabolischer Aktivität und Zellwachstum (Driks, 2009).

Die Milzbrandspore besteht aus einer Reihe von konzentrisch angeordneten Hüllen. Im Inneren liegt der Kern (*core*), in dem sich das Sporenchromosom sowie so genannte *small acid-soluble proteins* (SASPs) befinden. Die SASPs sind eng mit dem Chromosom verbunden und schützen dieses so vor UV-Strahlung und Hitze (Setlow, 2007). Als nächstes schließt sich eine Peptidoglycan-Schicht an, die *cortex* heißt und den Kern in erster Linie trocken hält (Setlow, 2003). Als nächstes kommt eine vielschichtige Proteinhülle, die *coat* (engl. für Mantel) heißt. Diese Hülle ist an der Oberfläche gefaltet und verhindert das Eindringen von degradierenden Enzymen, kleinen reaktiven Molekülen (z. B. Desinfektionsmittel) und anderen Mikroben. Die Oberfläche kann sich entfalten, wenn im Rahmen der Reifung der Spore Wasser in die Hülle eindringt (Driks, 1999). Außerhalb des *coat* befindet sich das Exosporium, eine Eiweißhülle, die nicht bei allen Bakterien der Gattung *Bacillus* vorkommt (Driks, 2009). Zwei Proteine des Exosporiums von *B. anthracis* wurden bisher identifiziert (BclA und BclB) und sie scheinen eine wichtige Rolle in der Umweltinteraktion der Spore zu haben. Als immunogene Komponente der Spore stellen diese Proteine

auch ein interessantes Antigen zur Impfstoffentwicklung gegen *B. anthracis* dar (Tournier et al., 2009b).

1.5 Impfstoffentwicklung gegen *B. anthracis*

1.5.1 Attenuierte Lebendimpfstoffe

Der von Pasteur entwickelte Impfstoff gegen *B. anthracis* aus abgeschwächten Bakterienkulturen zählt zu den ersten verfügbaren Lebendimpfstoffen überhaupt und fand in der Veterinärmedizin über Jahrzehnte breite Anwendung (Friedlander et al., 2002). Die Attenuierung der Milzbrandkulturen erfolgte durch Inkubation bei ca. 42°C, was zu einem Verlust des toxintragenden pXO1-Plasmids führt (Mikesell et al., 1983). Da aber das vom pXO1 kodierte PA eine wichtige Rolle für die Auslösung einer Immunantwort spielt, muss davon ausgegangen werden, dass die Impfstoffkulturen eine Mischung aus toxintragenden und nicht-toxintragenden Bacilli war (Friedlander et al., 2002).

Trotz der Effektivität stellten die Variabilität der Impfkulturen, die Instabilität sowie die relativ aufwendige Herstellung entscheidende Nachteile dar. Die Isolierung eines unbekapselten aber toxintragenden (pXO1⁺, pXO2⁻) Stammes von *B. anthracis* durch den Veterinär Max Sterne in Südafrika in den 1930er Jahren und dessen Weiterentwicklung zu einem abgeschwächten, sporenhaltigen Lebendimpfstoff war ein weiterer Meilenstein in der Anthraxforschung. Dieser *B. anthracis*-Stamm wurde in der Folge *Sterne*-Stamm benannt (Sterne, 1937b, 1939; Turnbull, 1991). Obwohl dieser Impfstoff in Nutztieren effektiv und sicher ist und weite Verbreitung gefunden hat, wurde er von den meisten Nationen aufgrund der verbleibenden Sicherheitsbedenken bezüglich der verbleibenden Pathogenität des Erregers sowie der Angst vor einer zu starken Impfreaktion mit starken Nebenwirkungen als nicht geeignet für die Verwendung beim Menschen betrachtet (Friedlander et al., 2002).

Dennoch wurde in der ehemaligen UdSSR 1953 ein Lebendimpfstoff, basierend auf einem dem *Sterne*-Stamm sehr ähnlichen STI-1 Stamm, lizenziert und in der Folge auch ausgiebig an Menschen getestet (Shlyakhov and Rubinstein, 1994). Da sporenbildende Lebendimpfstoffe gegen *B. anthracis* generell als effektiver gelten als zellfreie Komponentenimpfstoffe, sind bis heute zahlreiche weitere Entwicklungen einer vollständig apathogenen *Sterne*-Variante im Fokus der Forschung. Mögliche Mechanismen beruhen z. B. auf inaktivierenden Mutationen im Bereich der Toxin-Gene oder einer Störung der Sporenbildung. Ebenfalls wurde versucht PA in anderen Bakterienarten wie *B. subtilis*, *Salmonella enterica thyphimurium* oder *Lactobacillus* zu exprimieren und diese als Vektor für das Antigen zu verwenden (Friedlander and Little, 2009).

1.5.2 Impfstoffe basierend auf PA

Der aktuell in den USA und Großbritannien zugelassene Impfstoff *Anthrax Vaccine Adsorbed* (AVA – USA) bzw. *Anthrax Vaccine Precipitated* (AVP – UK) besteht vorrangig aus PA. Er enthält zusätzlich geringe Mengen EF und LF sowie weitere Proteine, deren Beitrag zum Schutz gegen *B. anthracis* unbekannt ist (Friedlander et al., 2002). Dieser zellfreie Impfstoff wird aus *Sterne* oder *Sterne*-ähnlichen Anthraxkulturen durch Aluminiumabsorption bzw. –präzipitation des gefilterten Kulturmediums gewonnen und wurde in den 50er und 60er Jahren in den USA bzw. Großbritannien entwickelt. Seit der Zulassung von AVA 1970 in den USA wird dort die Impfung von Berufsgruppen, die ein Expositionsrisiko tragen, empfohlen. Seit 1998 wird das militärische Personal systematisch gegen Anthrax geimpft (Friedlander et al., 1999). Es gibt keine systematischen Untersuchungen der Wirksamkeit des Impfstoffes beim Menschen. Tierexperimentelle Studien zeigen eine große Variabilität bezüglich der Effektivität, eine letale Milzbrandinfektion zu

verhindern. Deshalb und aufgrund der relativ schlechten Verträglichkeit sowie der zahlreichen Impfdosen, die notwendig sind, um einen anhaltenden Impftiter zu erreichen, sind die Bemühungen groß, einen neuen Impfstoff zu entwickeln. Die Weiterverwendung und erneute Lizenzierung des vorhandenen Impfstoffs in den USA wurde zuletzt 2002 aufgrund einer fehlenden Alternative von einer Expertenkommission empfohlen (Institute of Medicine (U.S.). Committee to Assess the Safety and Efficacy of the Anthrax Vaccine., 2002).

Sowohl in den Lebendimpfstoffen als auch in AVA wird PA die wichtigste Rolle in der Induktion einer Immunantwort zugeschrieben. Seit der Entdeckung des Toxinplasmids pXO1 und der Möglichkeit rekombinantes PA (rPA) herzustellen, wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die die Wirksamkeit von rPA untersuchten. Hier zeigte sich ein vergleichbarer Schutz wie unter AVA (Friedlander and Little, 2009). Es wurden bereits zwei Phase-1 Studien hierzu durchgeführt (Campbell et al., 2007; Gorse et al., 2006). Rekombinantes PA, in Kombination mit effektiveren und besser verträglichen Adjuvantien, scheint derzeit aussichtsreichster Kandidat für die nächste Generation eines Anthraximpfstoffs zu sein.

2 Stand der Forschung und Fragestellung der Arbeit

2.1 Dominant-negative Inhibitoren von PA (DNI)

Wie bereits oben beschrieben, ist die Toxinwirkung von *B. anthracis* von entscheidender Bedeutung für die volle Pathogenität des Erregers. In zahlreichen Studien wurde versucht, den zellulären Mechanismus der Intoxikation zu entschlüsseln. Das Milzbrandtoxin ist derzeit eines der am besten untersuchten Exotoxine in der Bakteriologie. Die Schritte von der Bindung des PA an den membrangebundenen Rezeptor bis zur Einschleusung der Enzymdomänen des EF und LF in das Zytosol der befallenen Zelle sind heute relativ gut verstanden. Die Analyse der Struktur des PA (von der Aminosäuresequenz bis zur kristallographischen Struktur des PA-Heptamers) hat es erlaubt, den einzelnen Domänen des PA eine Funktion bei der Toxinwirkung zuzuschreiben. So konnte man zeigen, dass gewisse Aminosäuren der Domäne 2 entscheidend für die Konformationsänderungen während der Porenbildung sind. Sellmann et al. demonstrierten wie gezielte Mutationen von einzelnen Aminosäuren, oder auch eine Kombination von verschiedenen Mutationen in diesem Bereich, zu einem Wirkungsverlust von LeTx führt, da die Enzymkomponente nicht mehr in das Zytosol transportiert werden kann (Sellman et al., 2001b). Die meisten dieser mutierten PA-Varianten assoziieren allerdings weiterhin mit dem zellulären Rezeptor, binden sowohl LF als auch EF und bilden Heptamere. In einer weiteren Studie konnten Sellmann et al. zeigen, dass manche dieser PA-Mutanten auch mit nativem PA ko-oligomerisiert und dadurch die durch wild-typ PA (wtPA) vermittelte Translokation von LF in das Zytosol verhindert wird (Sellman et al., 2001a). Insbesondere die Doppelmutation $\text{Lys}^{397} \rightarrow \text{Asp}^{397}$, $\text{Asp}^{425} \rightarrow \text{Lys}^{425}$ (K397D, D425K) zeigte besonders

starke inhibitorische Aktivität. Die weitere Analyse lässt vermuten, dass bereits eine einzige solche mutierte PA-Variante pro Heptamer ausreicht, um die Toxintranslokation zu verhindern. Diese Eigenschaft entspricht der eines sogenannten dominant-negativen Inhibitors (DNI), also eines Inhibitors, der nicht nur kompetitiv mit dem nativen PA um die Rezeptorbindung konkurriert, sondern zusätzlich auch wtPA und LF und EF an sich bindet und dabei die Toxinwirkung verhindert. Entsprechend konnte die gleichzeitige Gabe der DNI-Doppelmutante mit einer sonst tödlichen Dosis von LeTx in Mäusen die Intoxikationserscheinungen verhindern und alle getesteten Tiere überlebten (Sellman et al., 2001a). Weitere Charakterisierungen der Doppelmutante PA (K397D,D425K) und weiterer Mutanten mit drei oder vier Punktmutationen zeigten, dass bei der beschriebenen Doppelmutante eine sehr starke inhibitorische Wirkung mit ausreichender Stabilität der Heptamerkomplexe vorliegt (Yan and Collier, 2003). Daher wurde für die hier beschriebenen Experimente ausschließlich diese dominant-negative PA-Mutante verwendet. Diese wird fortan nur noch mit DNI bezeichnet. Ein weiterer Vorteil für die im Folgenden beschriebenen Experimente ist, dass bei DNI lediglich zwei Aminosäuren im Vergleich zu wtPA vertauscht sind und somit die Antigenität nicht wesentlich gegenüber PA verändert sein sollte.

2.2 Konjugierter Impfstoff gegen Kapsel und Toxin des *B. anthracis*

Obwohl hinlänglich bekannt ist, dass die Kapsel von *B. anthracis* eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Milzbrandinfektion spielt, sind die derzeit zugelassenen Impfstoffe zur Anwendung beim Menschen ausschließlich gegen PA und damit gegen die Toxinkomponente gerichtet. Dies beruht vor allem darauf, dass die PGA-Kapsel von *B. anthracis* nur äußerst schwach immunogen ist und nach Impfung mit

freier PGA keine nennenswerten Anti-PGA-Ak-Konzentrationen messbar sind (Ostroff et al., 1958). Obwohl die PGA-Kapsel mit ihrer geringen Antigenität relativ spezifisch für *B. anthracis* ist, kommen auch bei anderen Bakterien Kapseln vor, die nur eine schwache Immunantwort auslösen. Genannt seien hier vor allem die Polysaccharid-Kapseln der Erreger *Haemophilus influenza* Typ b, *Streptococcus pneumoniae* und *Neisseria meningitidis* Serogruppe C. Während Impfungen mit den isolierten Polysaccharid-Kapseln keine erfolgreiche Impfstrategie mit dauerhaftem Antikörperschutz darstellen (Makela et al., 1980; Peltola et al., 1977), haben sich konjugierte Impfstoffe, bei denen Kapselbestandteile kovalent an ein stark immunogenes Trägerprotein gebunden wurden, für alle drei genannten pathogenen Bakterien bewährt (Goldblatt, 2000). Dies wird vor allem durch den Übergang einer T-Zell-unabhängigen Immunantwort gegen Polysaccharide, in eine T-Zell-abhängige Immunreaktion, wie sie bei Protein-Antigenen vorkommt, erklärt (Baker, 1992).

Analog hierzu wurden bereits Anstrengungen unternommen, einen konjugierten Impfstoff gegen die PGA-Kapsel von *B. anthracis* zu entwickeln. Als potentes Antigen und Proteinträger ist hier vor allem PA interessant, da ein solcher Impfstoff neben der Induktion von Antikapsulären-Ak auch gleichzeitig Antitoxin-Ak induzieren würde und somit einen Impfstoff mit dualem Antikörperschutz zur Prophylaxe einer tödlichen Milzbrandsepsis darstellen würde. Unabhängig voneinander haben Schneerson et al. (Schneerson et al., 2003) sowie Rhie et al. (Rhie et al., 2003) einen solchen konjugierten Impfstoff entwickelt, der in den geimpften Mäusen einen hohen Antikörpertiter gegen PGA induzierte. Darüber hinaus konnte in beiden Studien demonstriert werden, dass diese Antikörper *in vitro* opsonierend wirkten und eine Phagozytose der PGA-bekapselten Bakterien begünstigten. Ein Expositionsversuch mit *B. anthracis* war aufgrund der Zugangsbeschränkung von pathogenen Anthraxstämmen in beiden Studien nicht möglich.

2.3 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Aus den o.g. Vorarbeiten ergaben sich folgende Fragestellungen für diese Dissertation:

- 1.) Ist die dominant-negativ inhibitorische Mutante DNI als Antigen in einem PA-basiertem Milzbrandimpfstoff geeignet um ausreichende und spezifische Anti-PA-Antikörper zu induzieren und somit einen Impfschutz gegenüber einer Milzbrandinfektion zu bewirken? Ein Impfstoff der auf dem Protein DNI basiert könnte bei dem V.a. eine Milzbrandinfektion einerseits als Antitoxin therapeutisch wirken und andererseits gleichzeitig eine Antikörperbildung gegen die Exotoxine von *B. anthracis* bedingen.
- 2.) Ein konjugierter Impfstoff basierend auf kovalent gebundenem PGA an das Protein PA ist in der Lage schützende antikapsuläre Antikörper zu induzieren. Ist DNI als dominant-negativ inhibitorische Mutante des PA ebenso als Trägerprotein für einen konjugierten Impfstoff mit PGA geeignet?
- 3.) Wenn die Impfung mit DNI oder einem DNI-PGA-Konjugat messbare Antikörper gegen PA und PGA auslöst, sind diese dann *in vivo* auch in der Lage schützend gegenüber einer normalerweise tödlichen Dosis von LeTx zu wirken?

3 Material und Methoden

3.1 Isolierung und Degradierung von γ -D-Polyglutaminsäure (PGA)

3.1.1 Bakterienstamm, Inokulation und Kultivierung

Wir erhielten *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a von der American Type Culture Collection. *B. licheniformis* wurde auf E-Medium Agar-Platten kultiviert. Sehr muköse Kolonien wurden ausgewählt und unter aeroben Bedingungen in Erlenmeyer-Kolben in flüssigem E-Medium kultiviert. 1 Liter E-Medium enthält: 20,0 g L-Glutaminsäure; 12,0 g Zitronensäure; 80,0 g Glycerol; 7,0 g NH_4Cl ; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,04 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,15 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,104 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Birrner et al., 1994) (alle Chemikalien: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Die Kulturen wurden bei 37°C inkubiert und für 96 h bei 250 rpm geschüttelt.

3.1.2 Gewinnung und Reinigung der PGA

Die stark visköse Bakterienkultur in den Erlenmeyerkolben wurde bei 6500 g für 20 min zentrifugiert, um die Bakterien zu entfernen. Der Überstand mit reichlich freier PGA wurde über Nacht bei 4°C mit dreifacher Menge Ethanol ausgefällt. Die ausgefallene PGA wurde durch Zentrifugation gesammelt und anschließend gegen deionisiertes Wasser ($\text{DI-H}_2\text{O}$) dialysiert, um Ethanol zu entfernen. Die dialysierte Lösung der PGA wurde mit 6 M HCl auf den pH 1,5 angesäuert und sofort durch Zugabe von dreifacher Menge 1-Propanol bei -20°C präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Präzipitat zweimal mit Aceton und dann einmal mit Ethyläther gewaschen und anschließend erneut gegen $\text{DI-H}_2\text{O}$ dialysiert. Zum Schluss wurde die Lösung gefriergetrocknet und als weißes Pulver aufbewahrt (Rhie et al., 2003). Die Reinheit und Struktur der PGA wurde durch UV/VIS-Spektroskopie

von 190 bis 300 nm Wellenlänge und mit ^1H -Magnetresonanzspektroskopie (NMR) kontrolliert und bestätigt.

3.1.3 Degradierung der PGA

Das Molekulargewicht der nativen im Kulturüberstand vorliegenden PGA von *B. licheniformis* liegt im Durchschnitt bei ~500 kDa (Oppermann-Sanio and Steinbuchel, 2002; Perez-Camero et al., 1999). PGA in dieser Größe ist hoch viskös und eine Konjugation mit Proteinen würde wahrscheinlich zu einem unlöslichen Gel führen, das für die Verwendung als Impfstoff ungeeignet wäre. Deshalb ist es notwendig, die PGA in kleinere Fragmente zu spalten. Die von Perez-Camero et al. (Perez-Camero et al., 1999) beschriebenen Spaltung der PGA mittels Ultraschall, ergab auch nach längerer Applikation lediglich ein durchschnittliches Molekulargewicht von ~50 kDa. Rhie et al. haben PGA dieser Größe erfolgreich für einen konjugierten Impfstoff verwendet (Rhie et al., 2003).

Wir interessierten uns dafür, ob kleinere PGA-Fragmente genauso oder vielleicht sogar besser für die Verwendung als Impfstoff geeignet sind. Um PGA-Fragmente mit der Größe von ca. 10 kDa zu erhalten, führten wir eine alkalische Hydrolyse durch (Kubota et al., 1996). 10 mg PGA wurden in 1 ml 2 M NaOH bei 80°C für 80 min hydrolysiert. Anschließend wurde die Lösung mit 6 M HCl neutralisiert und das Molekulargewicht der PGA-Fragmente mittels einer Superose 12 Chromatographiesäule (*Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC) gemessen. Als Standard wurden Dextrane der Größen 10, 20, 40, 110 und 150 kDa verwendet (Superose 12 und Dextranstandards von Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). PGA-Fragmente der Größe ~10 kDa wurden nach Gelfiltration gesammelt, gegen DI-H₂O dialysiert und gefriergetrocknet.

3.2 Herstellung der PGA-Protein Konjugate

Die Methode mittels Carbodiimiden Peptidbindungen zu synthetisieren wurde von Sheehan und Hess beschrieben (Sheehan and Hess, 1955). Die chemische Reaktion, die als Dehydratisierung (also Abspaltung von einem Molekül H_2O) bezeichnet werden kann, ist in Abbildung 2 dargestellt. Hierbei wird zunächst die C-terminale, freie Carboxylgruppe des PGA-Fragments unter Abspaltung eines Wasserstoff-Atoms an das zentrale Kohlenstoff-Atom des Diimids gebunden. Dieses instabile Produkt überträgt dann unter Abspaltung der ehemaligen Hydroxylgruppe am C-terminalen Ende der PGA dieses auf eine freie Aminogruppe des Trägerproteins (Bauminger and Wilchek, 1980). Hieraus entsteht eine neue

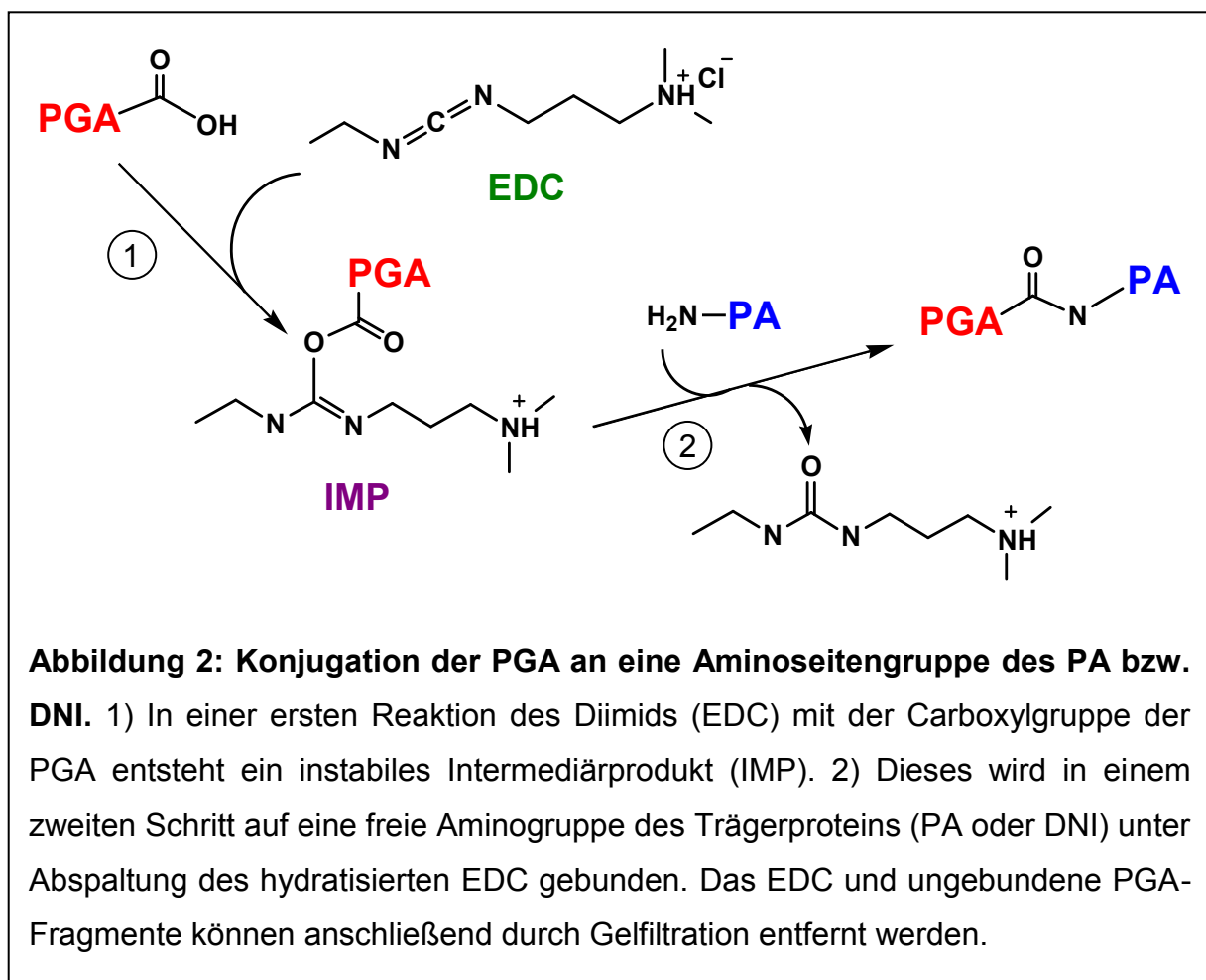


Abbildung 2: Konjugation der PGA an eine Aminoseitengruppe des PA bzw. DNI. 1) In einer ersten Reaktion des Diimids (EDC) mit der Carboxylgruppe der PGA entsteht ein instabiles Intermediärprodukt (IMP). 2) Dieses wird in einem zweiten Schritt auf eine freie Aminogruppe des Trägerproteins (PA oder DNI) unter Abspaltung des hydratisierten EDC gebunden. Das EDC und ungebundene PGA-Fragmente können anschließend durch Gelfiltration entfernt werden.

Peptidbindung an einer Aminoseitengruppe des Trägerproteins, die meist von der basischen Aminosäure Lysin stammt. Prinzipiell kann so an jeder Aminoseitengruppe des Trägerproteins eine Peptidbindung eingeführt werden. Man kann davon ausgehen, dass jeweils mehrere PGA-Fragmente pro Molekül PA bzw. DNI gebunden werden. Das verwendete Diimid 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC) ist gut wasserlöslich und wird ebenso wie alle anderen niedermolekularen Substanzen durch Gelfiltration eliminiert. Im Detail wurden die PGA-PA und PGA-DNI Konjugate gleichzeitig durch die identische Methode folgendermaßen hergestellt:

Die Proteine wtPA und DNI wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Professor John R. Collier zur Verfügung gestellt. Zu 1 mg PA bzw. DNI in 0,5 ml Phosphatpufferlösung (PBS, pH 7,0) wurde 0,5 mg PGA (~10 kDa) gegeben. Nachdem sich die PGA aufgelöst hatte, wurden 5 mg EDC (Sigma-Aldrich) hinzugegeben und die Lösung dann bei 25°C für 4 h gerührt. Anschließend wurde die Lösung in einer PD-10 Säule (Amersham Biosciences) gereinigt, die Konjugation und die Größe der Konjugate vor und nach Reinigung durch 10% SDS-PAGE kontrolliert und die Größe mit einem Standard (Seebblue® Plus2 Pre-stained Standard, Invitrogen) verglichen (Abbildung 3) (Rhie et al., 2003). Im Detail wurde ein kommerzielles SDS-PAGE-System der Firma Bio-Rad Laboratories (Ready Gel Cell) mit einem vorgefertigtem 10%-Gel (Ready Gel 10% Tris-HCl, Bio-Rad Laboratories) verwendet. Zu 10 µl der Proteinlösung wurden 20 µl des Probenpuffers (Katalognummer 161-0737, enthält: 2,9 ml DI-H₂O, 1,0 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2,0 ml Glycerol, 1,6 ml 10 % SDS, 0,4 ml β-Mercaptoethanol, 0,1 ml 1,0 % Bromphenolblau) gegeben und für 5 min auf 95°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Eis wurden 20 µl der Probe in die dafür vorgesehene Vertiefung des Gels, welches in die Elektrophoresekammer eingespannt wurde, mittels einer Pipette übertragen. In die

Elektrophoresekammer wurden 300 ml des Laufpuffers (Katalognummer 161-0732, 10-fach konzentrierte Lösung enthält: 15,0 g Tris, 72,0 g Glyzin, 5,0 g SDS in 500 ml DI-H₂O; pH 8,3) gefüllt und nach Anschluss der Elektroden die Elektrophorese bei 200 V für ca. 35 min durchgeführt. Nach vollständiger Auftrennung des Standards wurde die Elektrophorese beendet und das Gel aus der Kammer entfernt. Das Gel wurde danach mit Coomassie Blau R-250 (400 ml Methanol, 100 ml Essigsäure (100 %), 1 g Coomassie Blau R-250, 500 ml DI-H₂O) gefärbt und anschließend mit Essigsäurelösung (100 ml Essigsäure (100 %), 900 ml DI-H₂O) entfärbt.

Analog zur Konjugation von PA und PGA wurde EDC zur Herstellung von PGA-BSA (Bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich) Konjugaten verwendet. Diese BSA-PGA Konjugate dienten zum Nachweis von PGA spezifischen Antikörpern mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet wurden.

3.3 Impfung der Mäuse

Die verschiedenen Impfstoffe wurden an 6-8 Wochen alten, weiblichen BALB/c Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) in Gruppen zu je 8 Mäusen getestet. Der Impfstoff wurde dreimal in Abständen von zwei Wochen durch intraperitoneale (i.p.) Impfung verabreicht. Die Blutentnahmen aus einer Schwanzvene zur Antikörperbestimmung wurden vor Impfung und dann jeweils eine Woche nach jeder Impfung durchgeführt. Die Impfstoffe enthielten entweder PA, DNI oder die PGA-PA bzw. PGA-DNI Konjugate mit jeweils 10 µg Proteinanteil. Jede Dosis wurde in 50 µl PBS gelöst und dann an 50 µl eines Aluminium Hydroxyd Gel Adjuvanz (Al(OH)₃) (Sigma-Aldrich) mit 0,18 mg/Dosis adsorbiert. Als Negativkontrolle wurde parallel zu den anderen Gruppen eine Gruppe von Mäusen mit PBS-Al(OH)₃ geimpft.

3.4 Bestimmung der Antikörperkonzentration (ELISA)

3.4.1 Beschichtung der ELISA-Platten

Die Anti-PA und Anti-PGA Antikörperkonzentrationen im Serum wurden mittels ELISA gemessen. Immulon 96-well Maxisorp Platten (Nalge Nunc, Rochester, NY) wurden für 16 h bei 4°C mit 100 µl PA oder PGA-BSA Konjugat der Konzentration 2,5 µg/ml, gelöst in 0,1 M Carbonat Puffer (Beschichtungspuffer), beschichtet. 1 l Beschichtungspuffer enthält 10,6 g Natriumkarbonat (Na_2CO_3) und 0,2 g Natriumazid (NaN_3) titriert mit 6 M HCl auf pH 9,6.

Die ersten beiden Reihen für die Messung der Standardkurve wurden mit 100 µl eines Ziegen F(ab')_2 Anti-Maus-IgG Antikörper (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) der Konzentration 2,5 µg/ml parallel zu PA bzw. PGA-BSA beschichtet.

3.4.2 Messung der Antikörperkonzentration im Serum

Sieben Tage nach jeder Impfung mit den Konjugaten oder den unkonjugierten Proteinen wurden jeweils einige Tropfen Blut aus der Schwanzvene der immunisierten Mäuse entnommen. Dieses Blut wurde in Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf, Hauppauge, NY) gesammelt. Nach abgelaufener Koagulation wurde das Serum durch Zentrifugation gewonnen. Die Serumproben der Mäuse wurden jeweils separat in ein frisches, speziell beschriftetes Röhrchen pipettiert und bei 4°C bis zum nächsten Tag aufbewahrt. Die Serumproben wurden je nach Antikörperkonzentration 1:20 bis 1:10000 in Tris Puffer (50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,4) verdünnt und 5% Kälberserum hinzugefügt. Nach dreimaligem Waschen der Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl der Serumproben als Duplikate in die Vertiefungen gegeben und bei 37°C für 90 min inkubiert. Anschließend wurde die Platte wiederum dreimal

gewaschen. Es folgte ein zweiter Inkubationsschritt mit Ziegen Anti-Maus-IgG (Southern Biotech) Antikörper, die an alkalische Phosphatase (AP) konjugiert waren. Hierfür wurden jeweils 100 µl des Anti-Maus-IgG-AP einer Konzentration von 0,5 µg/ml hinzugegeben und bei 37°C für 90 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Platten mit para-Nitro-Phenyl-Phosphat (pNPP) (Sigma-Aldrich) entwickelt und die Absorption bei den Wellenlängen 405 und 630 nm gemessen. Für die Standardkurve wurde vor dem ersten Inkubationsschritt statt des Mäuseserums in die ersten beiden Reihen Mäuse-IgG (Southern Biotech) bekannter Konzentration in 1:2 Serienverdünnung gegeben.

3.5 Kompetitiver ELISA

Genauso wie bei der Anti-PA Antikörperbestimmung wurden die ELISA Platten mit 2,5 µg/ml PA über Nacht bei 4°C beschichtet und dann nach dreimaligem Waschen mit 100 µl BSA (Sigma-Aldrich) einer Konzentration von 100 µg/ml für 60 min bei 30°C geblockt. 75 µl der Serumproben nach der 3. Immunisierung in Verdünnung 1:20000 wurden mit 75 µl PA, das in Duplikaten als 1:3 Serienverdünnung angelegt war, gemischt und anschließend wurden jeweils 100 µl des Gemischs auf die beschichtete ELISA Platte übertragen. Die Inkubation und Entwicklung erfolgte analog zur oben beschriebenen Antikörperbestimmung. Danach wurde die prozentuale Inhibition durch „freies“ PA berechnet (Wang et al., 2003).

3.6 Expositionsversuch der geimpften Mäuse mit PA und LF

Um das Potenzial von DNI und DNI-Konjugat als Impfstoff gegen *B. anthracis* abzuschätzen, untersuchten wir, ob die Impfungen gegen eine Injektion von LeTx schützen. Drei Wochen nach der letzten Impfung wurde jeder Maus eine Mischung von 48 µg PA und 20 µg LF (List Biologicals, Campbell, CA) in die Schwanzvene

injiziert. Dies entspricht in etwa der vierfachen 50% tödlichen Dosis von LeTx für Mäuse (LD50%) (Price et al., 2001). Die Mäuse wurden nach Injektion für 2 h durchgehend und anschließend in vier bis acht stündigen Intervallen beobachtet. Die Toxinempfindlichen Tiere starben innerhalb der ersten 36 h und wurden aus den Käfigen entfernt. Die überlebenden Mäuse des Toxinversuchs wurden für die ersten 14 d im Anschluss an den Exposition mit LeTx sorgfältig überwacht.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung und Reinigung der PGA

Die Kulturen von *B. licheniformis* wurden bei 37°C für 96 h inkubiert. In den ersten 60 h der Inkubation wurde eine Wachstumskurve mittels Messung der OD bei einer Wellenlänge von 660 nm durchgeführt. Hier zeigten sich vor allem in den ersten 20 h der Inkubation eine exponentielle Zunahme der OD und anschließend eine flacher verlaufende Kurve. Eine Messung der Bakterienzahl nach 18 h ergab im Mittel $7,3 \times 10^8$ Zellen pro Erlenmeyerkolben (1 Liter).

Nach 96 h Kultivierung von *B. licheniformis* in E-Medium entstand eine trübe Lösung, die ein Gemisch aus Bakterien und freier, in Lösung sezernierter PGA beinhaltete. Die PGA wurde wie in Abschnitt 3.1 beschrieben aufgereinigt und das nach Gefriertrocknung erhaltene weißliche Pulver nach Auswiegen in 10 mg Portionen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Zur weiteren Verwendung wurden dann die Proben in PBS (pH 7,0) gelöst und in 10 kDa große PGA-Fragmente degradiert.

4.2 Konjugiertes PGA-PA, PGA-DNI und PGA-BSA

Die unkonjugierten Proteine PA und DNI sowie die durch Peptidbindung kovalent verbundenen Konjugate PA-PGA und DNI-PGA wurden vor der Verwendung nochmals mittels SDS-PAGE kontrolliert. Nach Reinigung in einer PD-10 Säule wurden 20 µl der Proteine im SDS-Gel aufgetrennt. Wie aus Abbildung 3 ersichtlich ist, bilden die unkonjugierten Proteine PA und DNI jeweils eine isolierte Bande im Größenbereich von 83 kDa. Nach Konjugation entsteht eine breite Bande, die im Bereich der Größe der unkonjugierten Proteine beginnt und dann Moleküle unterschiedlicher Größenordnung, je nach Anzahl der gebundenen PGA-Fragmente, anzeigt.

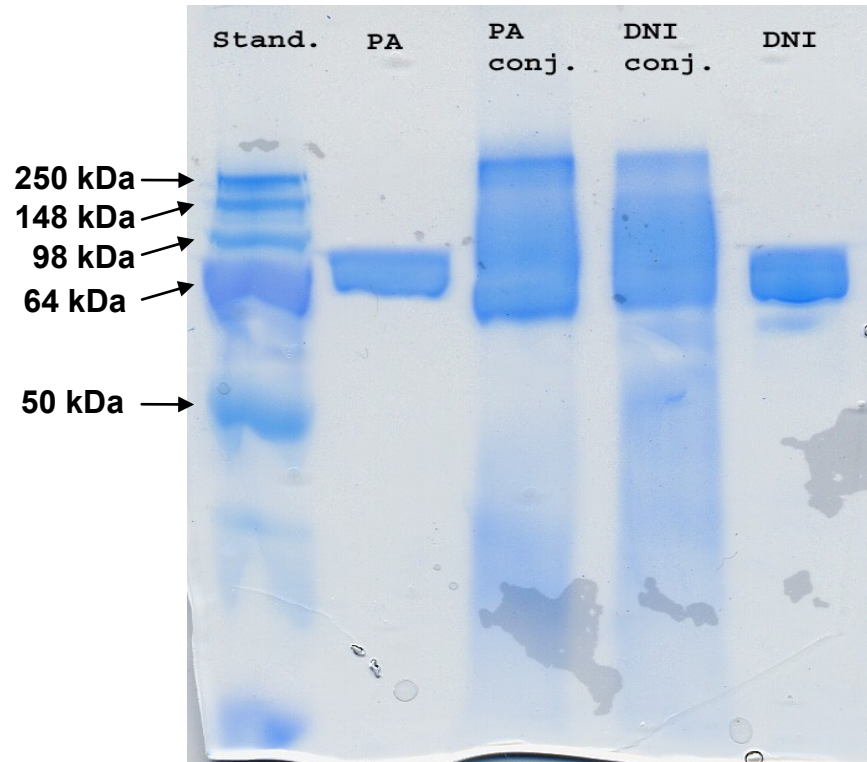


Abbildung 3: 10% SDS-PAGE Gelelektrophorese - Darstellung der unkonjugierten Proteine PA und DNI, sowie der PA-PGA und DNI-PGA Konjugate. Die unkonjugierten Proteine entsprechen dem bekannten Molekulargewicht von 83 kDa. Die breite Bande in der Fraktion der Konjugate stellt ein Gemisch aus verschieden großen Fragmenten dar, da eine unterschiedliche Anzahl von PGA-Molekülen pro Proteinmolekül kovalent gebunden wurde.

4.3 Antikörper gegen PA durch Impfung von PA und DNI

Die Bestimmung der Antikörperkonzentration gegen PA erfolgte über einen quantitativen ELISA. Hierzu wurde, wie beschrieben, eine Mikrotiterplatte mit nativem PA beschichtet, an welches die gebildeten Anti-PA Mausantikörper des entnommenen Serums binden konnten. Die gebundenen Antikörper wurden dann über einen Ziegen Anti-Maus-IgG Antikörper detektiert. Eine typische Standardkurve wie sie für jede ELISA-Platte angelegt wurde ist mit dem für die Konzentrationsberechnung verwendeten linearen Abschnitt ist in Abbildung 4

exemplarisch dargestellt. Die Mausseren wurden entsprechend verdünnt um einen Konzentrationsbereich im linearen Abschnitt der Standardkurve zu erreichen und die entsprechenden Konzentrationen anhand der Geradengleichung berechnet.

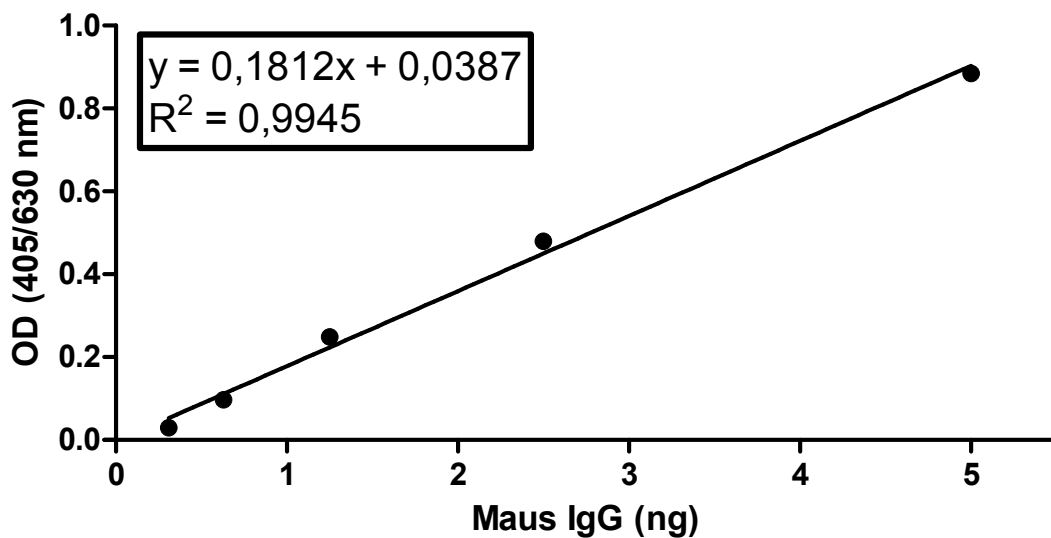
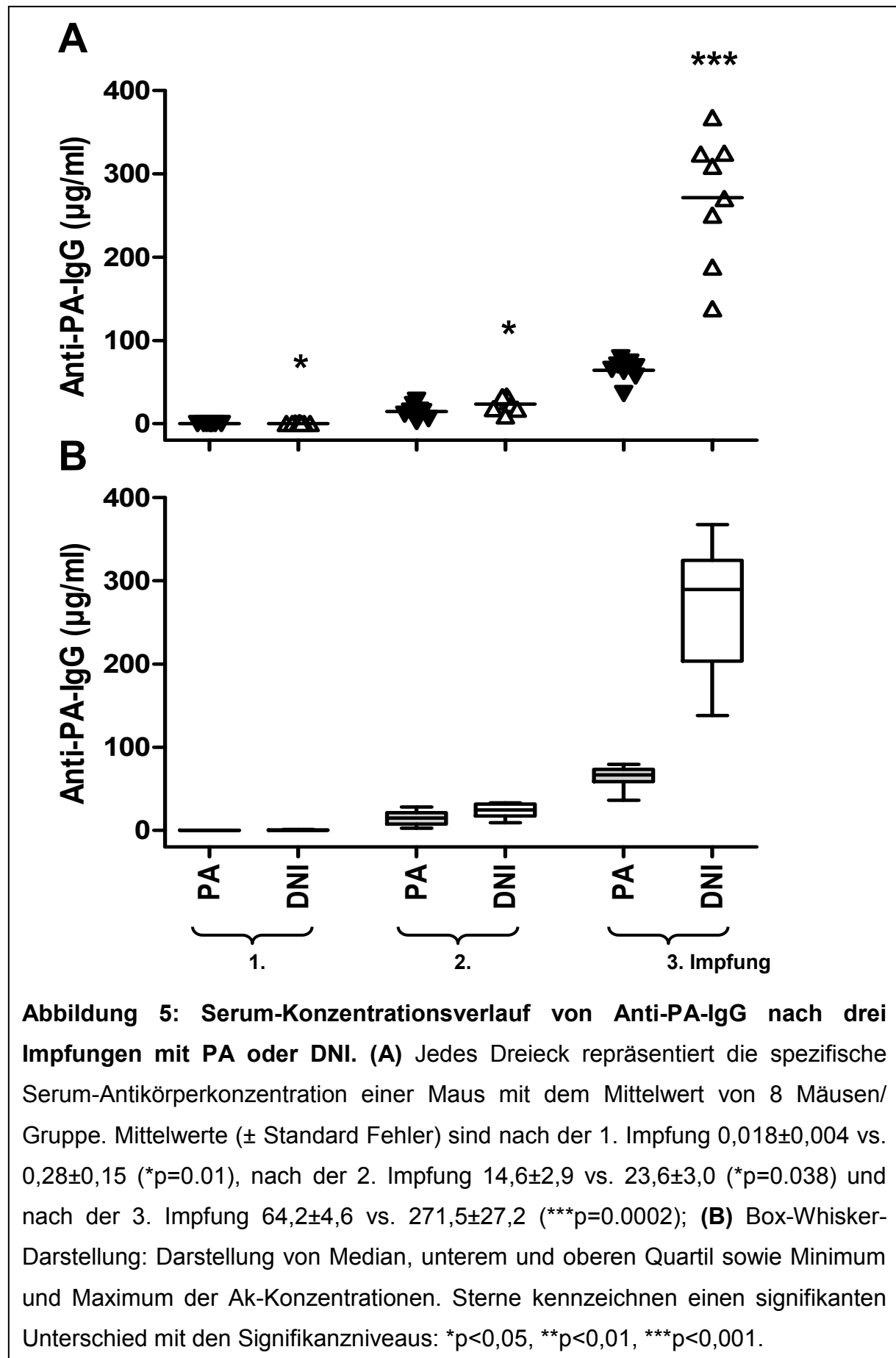


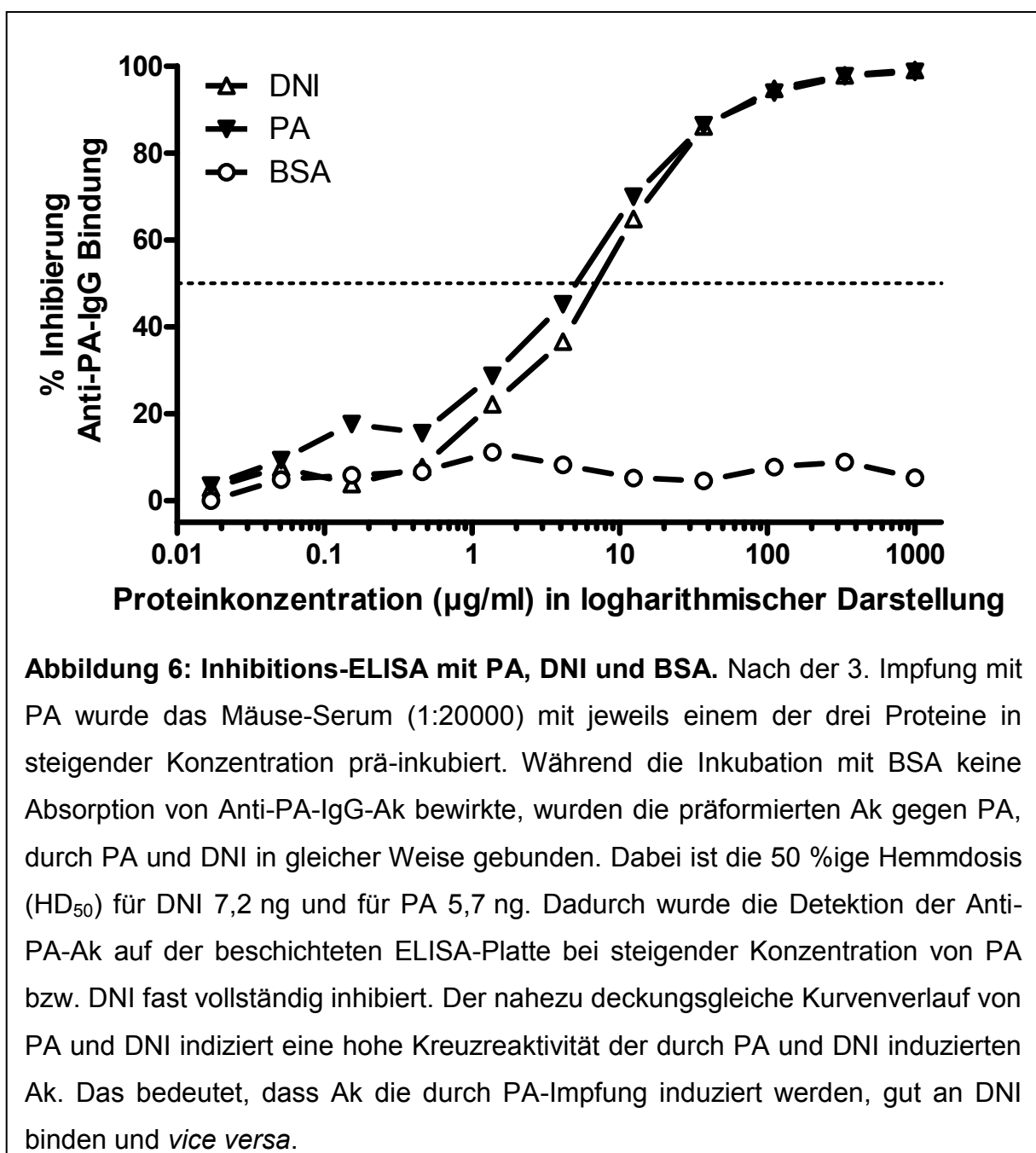
Abbildung 4: Exemplarische Standardkurve eines IgG-ELISAs: Ein Maus IgG-Standard wurde in absteigenden Konzentrationen von 20 bis 0,02 ng (Serienverdünnung) aufgetragen. Für die Berechnung der unbekannten Antikörperkonzentrationen der getesteten Seren, wurde eine Geradengleichung für die optische Dichte (OD) der Standards zwischen 5 und 0,3 ng verwendet. Die Mausseren wurden entsprechend verdünnt, so dass die OD im linearen Bereich der Standardkonzentrationen lagen.

Abbildung 5 zeigt die gemessenen Anti-PA-IgG-Konzentrationen nach der ersten Impfung (Impfung zum Zeitpunkt 0, Blutentnahme 1 Woche danach: 0+1 Woche) sowie nach der ersten (2+1 Woche) und zweiten (4+1 Woche) Boosterimpfung mit PA bzw. DNI. Die Anti-PA-IgG-Konzentrationen lagen nach der ersten Immunisierung mit PA zwischen 0,010 µg/ml und 0,038 µg/ml mit einem Mittelwert von 0,018 µg/ml \pm 0,004 µg/ml (Mittelwert \pm Standardfehler), nach der zweiten Immunisierung zwischen 2,6 µg/ml und 28,0 µg/ml mit einem Mittelwert von 14,6 µg/ml \pm 2,9 µg/ml und nach der dritten Immunisierung zwischen 36,3 µg/ml und 79,2 µg/ml mit einem Mittelwert von 64,2 µg/ml \pm 4,6 µg/ml. In den acht Mäusen, die mit DNI geimpft wurden, lagen die Anti-PA-IgG-Konzentrationen nach der ersten Immunisierung zwischen 0,018 µg/ml und 1,135 µg/ml mit einem Mittelwert von 0,028 µg/ml \pm 0,15 µg/ml, nach der zweiten Immunisierung zwischen 9,1 µg/ml und 33,1 µg/ml mit einem Mittelwert von 23,6 µg/ml \pm 3,0 µg/ml und nach der dritten Immunisierung zwischen 138,0 µg/ml und 367,6 µg/ml mit einem Mittelwert von 271,5 µg/ml \pm 27,2 µg/ml.

In der 2-Way-ANOVA ergibt sich hieraus ein hoch signifikantes Ergebnis ($p < 0,001$) für die Faktoren Behandlung (PA vs. DNI) und Zeit (entspricht dem Verlauf von ersten Impfung hin zu ersten und zweiten Boosterimpfung) sowie eine signifikante Interaktion zwischen Behandlung und Zeitverlauf ($p < 0,001$). In der post-hoc Analyse der einzelnen Zeitpunkte ergibt sich jeweils eine signifikant höhere Anti-PA-IgG-Konzentration in der Gruppe der DNI geimpften Mäuse verglichen mit den PA geimpften Mäusen mit den Signifikanzniveaus von $p = 0,010$ nach der ersten Impfung, $p = 0,038$ nach der zweiten Impfung und $p = 0,0002$ nach der dritten Impfung (Mann-Whitney-Test für nicht-parametrische Stichproben).



Die durch PA- und DNI-Impfung induzierten Antikörper konnten beide durch Bindung an die mit nativem PA beschichteten Mikrotiterplatten detektiert werden. Eine vollständige Kreuzreaktivität der Antikörper gegen beide Proteine und damit eine Vergleichbarkeit der Antikörperkonzentrationen leitet sich daraus hingegen nicht ab. Die Ergebnisse des Inhibitions-ELISAs sind in Abbildung 6 dargestellt. Hier wurde die kompetitive Inhibition der Maus Anti-PA-IgG-Antikörper Bindung an die PA beschichtete ELISA-Platte durch vorherige Inkubation mit freiem PA, DNI oder BSA



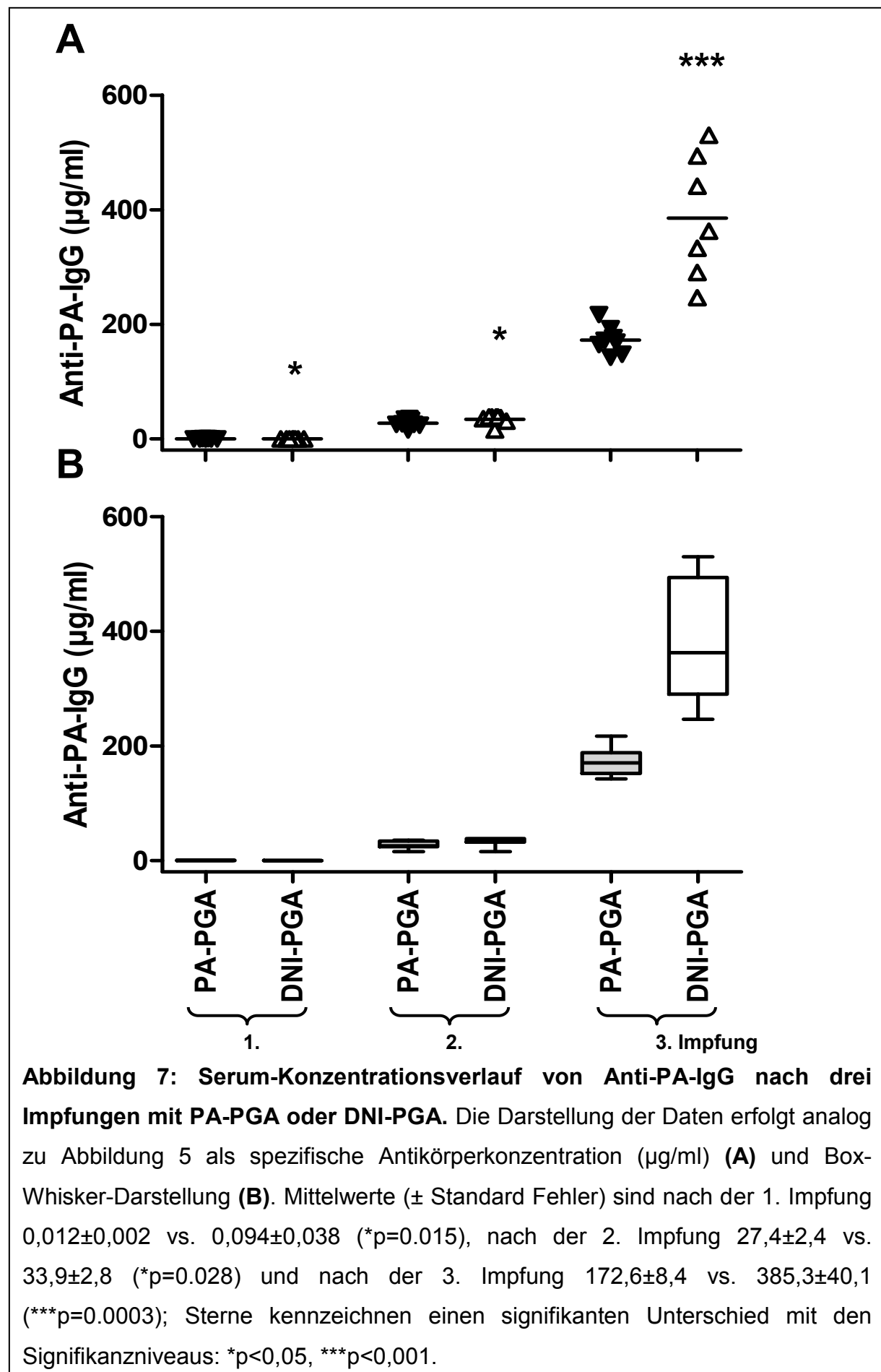
gemessen. PA und DNI verhindern mit derselben Hemmkonzentration die Bindung von Anti-PA-Antikörper an die ELISA-Platte. Eine vorherige Inkubation des Mausserums mit ca. 7,2 ng DNI bzw. 5,7 ng PA in je 75 μ l führt zu einer 50%igen Inhibition der Anti-PA-Antikörperbindung an die ELISA-Platte. Hingegen verhindert eine Prä-Inkubation mit BSA mit Konzentrationen bis 1000 μ g/ml nicht die Anti-PA-Antikörperbindung an die PA beschichtete Mikrotiterplatte (Abbildung 6).

4.4 Antikörper gegen PA durch Impfung von PA- und DNI-PGA

Die Bestimmung der Antikörperkonzentrationen gegen PA durch Impfung mit den Konjugaten aus dem Kapselbestandteil PGA und PA bzw. DNI erfolgte analog zur Impfung mit den unkonjugierten Proteinen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

Die Anti-PA-IgG-Konzentrationen lagen nach der ersten Immunisierung mit PA-PGA zwischen 0,006 μ g/ml und 0,021 μ g/ml mit einem Mittelwert von 0,012 μ g/ml \pm 0,002 μ g/ml, nach der zweiten Immunisierung zwischen 15,4 μ g/ml und 35,6 μ g/ml mit einem Mittelwert von 27,4 μ g/ml \pm 2,4 μ g/ml und nach der dritten Immunisierung zwischen 142,3 μ g/ml und 216,7 μ g/ml mit einem Mittelwert von 172,6 μ g/ml \pm 8,4 μ g/ml. In den mit DNI-PGA geimpften Mäusen lagen die Anti-PA-IgG-Konzentrationen nach der ersten Immunisierung zwischen 0,007 μ g/ml und 0,304 μ g/ml mit einem Mittelwert von 0,094 μ g/ml \pm 0,038 μ g/ml, nach der zweiten Immunisierung zwischen 15,5 μ g/ml und 38,3 μ g/ml mit einem Mittelwert von 33,9 μ g/ml \pm 2,8 μ g/ml und nach der dritten Immunisierung zwischen 246,5 μ g/ml und 530,2 μ g/ml mit einem Mittelwert von 385,3 μ g/ml \pm 40,1 μ g/ml.

Die statistische Analyse mittels 2-Way-ANOVA ergibt hier sowohl ein hoch signifikantes Ergebnis für die Faktoren Behandlung (PA-PGA vs. DNI-PGA)



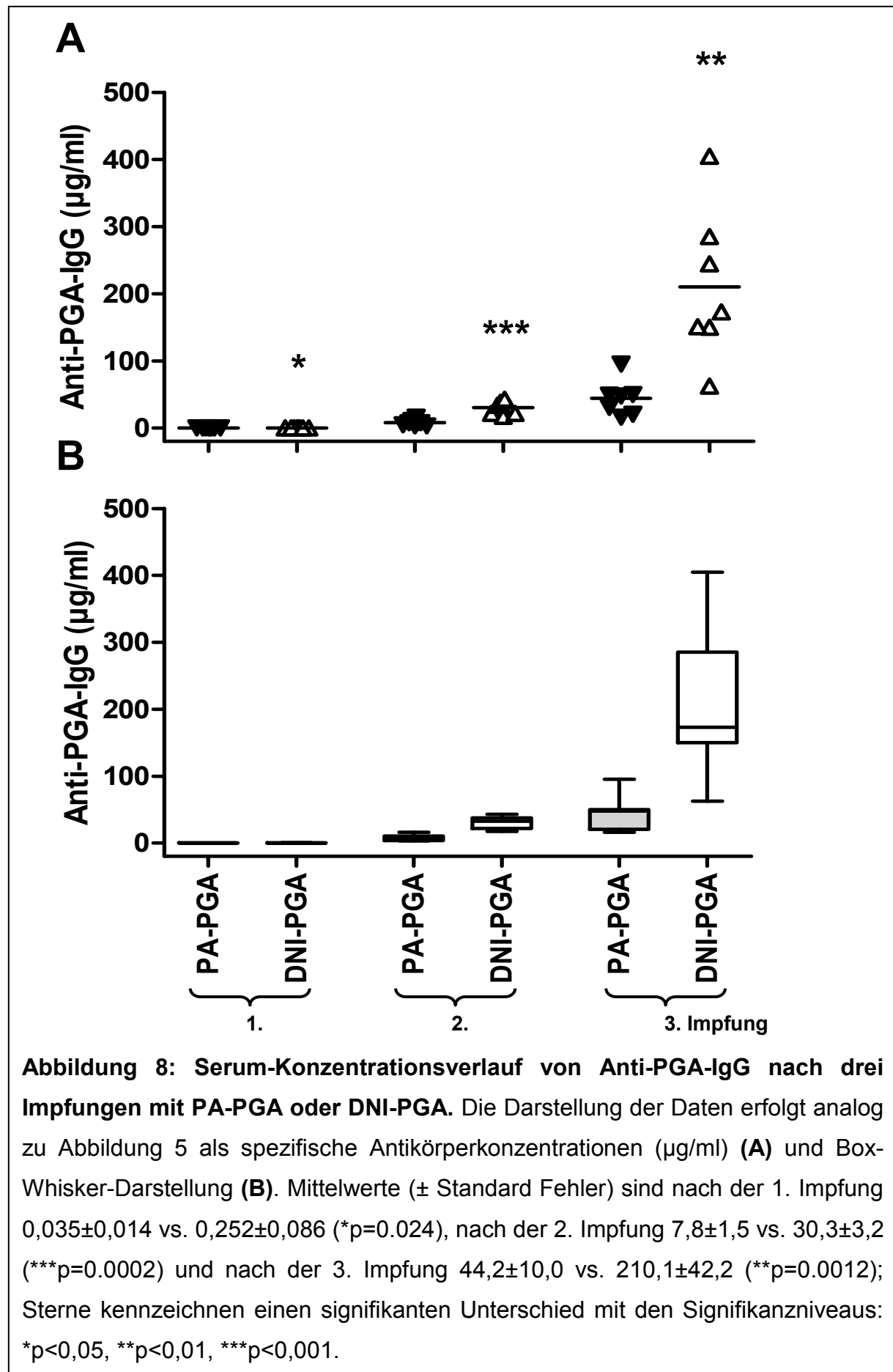
($p < 0.001$) als auch für den zeitlichen Verlauf ($p < 0,001$) und die Interaktion ($< 0,001$). In der post-hoc Analyse ergibt der Mann-Whitney-Test ein signifikant höheren Anti-PA-IgG-Titer in der DNI-PGA-Gruppe gegenüber der PA-PGA-Gruppe mit den p-Werten von 0,0148 nach der ersten, 0,0281 nach der zweiten und 0,0003 nach der dritten Impfung.

4.5 Antikörper gegen PGA durch Impfung mit den PGA-Konjugaten

Um die Antikörperkonzentrationen gegen PGA und damit gegen die *B. anthracis* Kapsel zu messen, wurde ein quantitativer Anti-PGA ELISA entwickelt. Anders als PA, welches als Protein gut an die Plastikoberfläche der Microtiterplatte haften bleibt, kann PGA nicht ohne weiteres zur Beschichtung der ELISA-Platte verwendet werden. Daher wurde PGA zunächst kovalent an BSA gebunden. Diese Verbindung wurde analog zu der PGA-PA bzw. PGA-DNI Konjugation hergestellt. Mittels der BSA-PGA beschichteten ELISA-Platten konnten dann spezifisch die Anti-PGA-IgG Konzentrationen der mit den Konjugaten geimpften Mäuse gemessen werden.

Mäuse, die mit unkonjugierter PGA oder nativem PA bzw. DNI geimpft wurden, produzierten auch nach der dritten Impfung keine messbaren Antikörperkonzentrationen gegen PGA (PGA: $-0,003 \mu\text{g/ml} \pm 0,005 \mu\text{g/ml}$; PA: $-0,482 \mu\text{g/ml} \pm 0,022 \mu\text{g/ml}$; DNI: $-0,480 \mu\text{g/ml} \pm 0,022 \mu\text{g/ml}$). Hingegen induzierten die beiden konjugierten Impfstoffe PA-PGA und DNI-PGA hohe Konzentrationen spezifischer Anti-PGA-Antikörper (Abbildung 8).

Nach der ersten Immunisierung mit PA-PGA lagen die Anti-PGA-IgG-Konzentrationen zwischen $0,001 \mu\text{g/ml}$ und $0,101 \mu\text{g/ml}$ mit einem Mittelwert von $0,035 \mu\text{g/ml} \pm 0,014 \mu\text{g/ml}$, nach der zweiten Immunisierung zwischen $3,1 \mu\text{g/ml}$ und $16,0 \mu\text{g/ml}$ mit einem Mittelwert von $7,8 \mu\text{g/ml} \pm 1,5 \mu\text{g/ml}$ und nach der dritten Immunisierung zwischen $16,0 \mu\text{g/ml}$ und $95,3 \mu\text{g/ml}$ mit einem Mittelwert von



44,2 µg/ml ± 10,0 µg/ml. Nach der ersten Immunisierung mit DNI-PGA lagen die Anti-PA-IgG-Konzentrationen zwischen 0,009 µg/ml und 0,733 µg/ml mit einem Mittelwert von 0,252 µg/ml ± 0,086 µg/ml, nach der zweiten Immunisierung zwischen 17,5 µg/ml und 43,2 µg/ml mit einem Mittelwert von 30,3 µg/ml ± 3,2 µg/ml und nach der dritten Immunisierung zwischen 62,5 µg/ml und 404,7 µg/ml mit einem Mittelwert von 210,1 µg/ml ± 42,2 µg/ml.

In der 2-Way-ANOVA ergibt sich für den Vergleich von Anti-PGA-Ak-Konzentrationen nach PA-PGA- bzw. DNI-PGA-Immunisierung ein hoch signifikantes Ergebnis für die Faktoren Behandlung ($p < 0.001$) als auch für den zeitlichen Verlauf ($p < 0.001$) und die Interaktion ($p < 0.001$). In der post-hoc Analyse ergibt der Mann-Whitney-Test einen signifikant höheren Anti-PA-IgG-Titer in der DNI-PGA-Gruppe gegenüber der PA-PGA-Gruppe mit den p-Werten von 0,0238 nach der ersten, 0,0002 nach der zweiten und 0,0012 nach der dritten Impfung.

4.6 Anti-PA-Ak-Konzentration nach Impfung mit konjugierten vs. unkonjugierten Impfstoff

Abbildung 9 stellt den direkten Vergleich von Antikörperkonzentrationen gegen PA nach Impfung mit PA bzw. DNI sowie nach Impfung mit den Konjugat-Impfstoffen PA-PGA und DNI-PGA dar. Hier zeigt sich nach Impfung mit beiden Konjugaten eine signifikant höhere Anti-PA-IgG-Konzentration als nach Impfung mit dem jeweils unkonjugierten Protein.

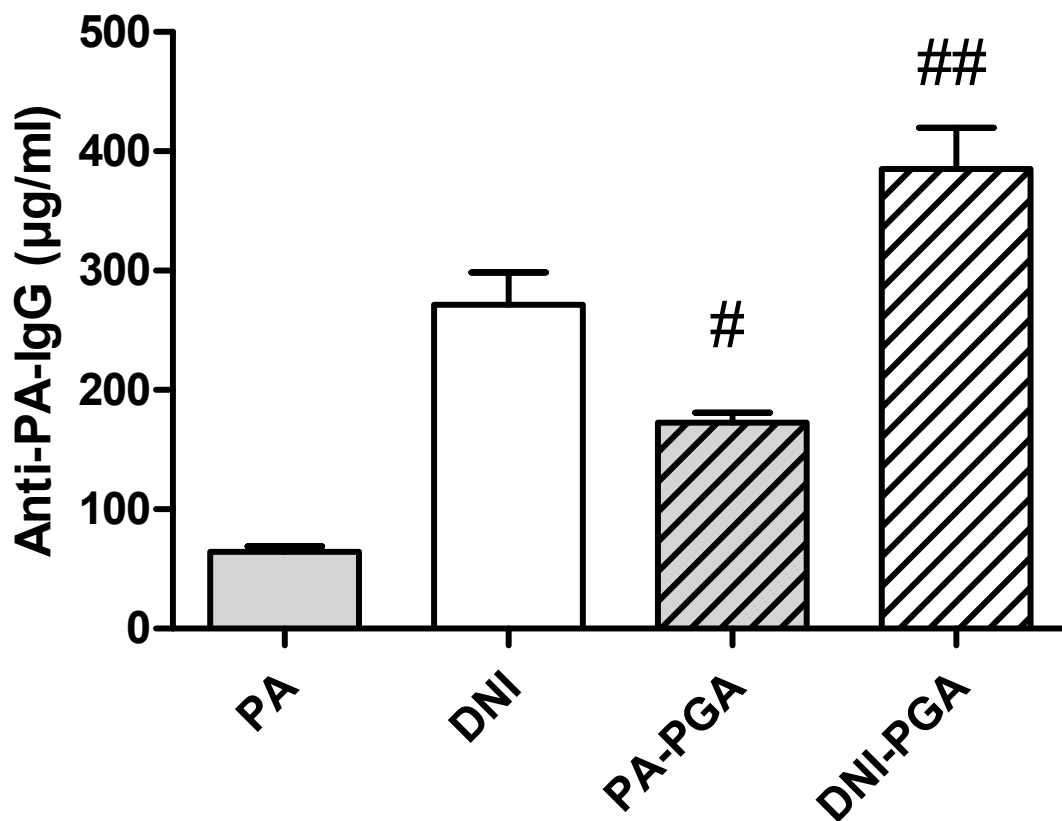


Abbildung 9: Serum-Konzentration von Anti-PA-IgG nach der 3. Impfung mit PA, DNI oder deren PGA-Konjugaten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert von 8 Mäusen/Gruppe (\pm Standard Fehler). PA-PGA resultiert in signifikant höheren Anti-PA-Ak-Konzentrationen als PA alleine. Ebenfalls resultiert das DNI-PGA Konjugat in signifikant höheren Ak-Konzentrationen als DNI alleine. Damit zeigen die Konjugate mit PGA eine verbesserte Immunantwort gegenüber den unkonjugierten Proteinen. Das Rautensymbol symbolisiert die Signifikanzniveaus: # $p < 0,05$ und ## $p < 0,01$.

Die Antikörperkonzentrationen gegen PA bzw. PGA aller Impfgruppen nach der ersten, zweiten und dritten Immunisierung sind nochmals zur Übersicht in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Antikörper-Konzentrationen nach der 1., 2. und 3. Impfung

Anti-PA-IgG ($\mu\text{g/ml}$)				
Impfstoff	DNI	PA	DNI-PGA	PA-PGA
1. Impfung	0,028 \pm 0,15*	0,018 \pm 0,04	0,094 \pm 0,038*	0,012 \pm 0,002
2. Impfung	23,6 \pm 3,0*	14,6 \pm 2,9	33,9 \pm 2,8*	27,4 \pm 2,4
3. Impfung	271,5 \pm 27,2***	64,2 \pm 4,6	385,3 \pm 40,1*** [#]	172,6 \pm 8,4 [#]

Anti-PGA-IgG ($\mu\text{g/ml}$)		
Impfstoff	DNI-PGA	PA-PGA
1. Impfung	0,252 \pm 0,086*	0,035 \pm 0,014
2. Impfung	30,3 \pm 3,2***	7,8 \pm 1,5
3. Impfung	210,1 \pm 42,2**	44,2 \pm 10,0

*Signifikant höhere Ak-Konzentrationen als PA bzw. PA-PGA in den mit DNI bzw. DNI-PGA geimpften Mäusen. Die Sterne zeigen die Signifikanzniveaus an: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

[#]Signifikant höhere Ak-Konzentrationen der Konjugate im Vgl. zu den nativen Proteinen. Das Rautensymbol zeigt die Signifikanzniveaus an. [#] $p < 0,05$; ^{##} $p < 0,01$.

4.7 Protektion gegen LeTx

Um zu testen, ob die durch DNI induzierten Anti-PA-IgG Antikörper auch tatsächlich gegen eine Exposition mit LeTx schützen, wie sie während einer Infektion mit *B. anthracis* zu erwarten ist, injizierten wir verschiedenen Gruppen von Mäusen eine hohe Dosis von LeTx. Jeder Maus wurden eine Mischung von 48 μg PA und 20 μg LF in die Schwanzvene injiziert. Dies entspricht in etwa der vierfachen 50% letalen Dosis (LD50%) von LeTx für Mäuse. Sämtliche Mäuse, die entweder mit DNI, PA oder deren PGA-Konjugaten geimpft wurden, überlebten den Toxinexpositionsversuch, was auf ausreichende Konzentrationen an Anti-PA-IgG schließen lässt. Ausnahmslos alle Mäuse der Negativkontrolle, d. h. Mäuse, die mit PGA oder PBS mit Adjuvant geimpft wurden und auch keine nachweisbaren Konzentrationen an Anti-PA-IgG aufwiesen, starben nach der Exposition mit LeTx (Tabelle 2). Mäuse, die keine schützenden Antikörper besaßen, zeigten eine geringe Hyperaktivität im Anschluss an die Injektion, der bald ein Auftreiben des Rumpfes

folgte. Ab diesem Zeitpunkt machten die Mäuse einen schwer kranken und lethargischen Eindruck und verstarben innerhalb weniger Stunden bis maximal 36 h. Demgegenüber zeichneten sich Mäuse mit schützenden Antikörper durch eine wenige Stunden andauernde Phase reduzierter Aktivität im Anschluss an die Injektion aus. Im Verlauf erholten sich alle Mäuse dieser Gruppen relativ rasch und zeigten im Beobachtungszeitraum von zwei Wochen keine Zeichen von Krankheit oder reduziertem Zustand.

Tabelle 2: Schutz der geimpften Tiere vor Exposition mit LeTx*

Verabreichte Impfung	DNI	DNI-PGA	PA	PA-PGA	Kontrolle
N Überlebt / N Exponiert	8/8	8/8	8/8	8/8	0/10

*Jeder exponierten Maus wurden 55 µg PA und 20 µg LF in die Schwanzvene injiziert

5 Diskussion

Die Verwendung von *B. anthracis* als Kampfstoff und die Gefahr des Bioterrorismus haben vor allem in den USA großes Interesse an der Entwicklung eines sicheren und wirksamen Impfstoffs gegen Milzbrand beim Menschen hervorgerufen. Diese Entwicklung hat insbesondere nach den Terroranschlägen vom 11. September 2001 und den folgenden durch einen US-Forscher verübten Briefanschlägen mit Milzbrandsporen in Teilen der USA an Brisanz gewonnen (Franz, 2009; Greenberg, 2001; Nabel, 2009). Das Auftreten mehrerer Milzbrandfälle bei i.v.-Drogenabhängigen in Deutschland und im Vereinigten Königreich (UK) in den letzten Jahren sowie die vom Robert-Koch-Institut herausgegebenen Warnungen im Epidemiologischen Bulletin (RKI, 2010b) und dem Deutschen Ärzteblatt (Bernard et al., 2010) unterstreicht die Notwendigkeit, weiterhin bezüglich des Krankheitsbildes der Milzbrandinfektion wachsam zu sein. Darüber hinaus ist eventuell auch Deutschland, als potenzielles Ziel des internationalen Terrorismus durch Biowaffen wie z. B. Milzbrandsporen, gefährdet (Communities, 2003; Heesemann, 2007). Der derzeit in den USA lizenzierte Impfstoff AVA gilt als sicher und wirksam, wobei systematische Analysen zum Schutz größerer Populationen fehlen (Institute of Medicine (U.S.). Committee to Assess the Safety and Efficacy of the Anthrax Vaccine., 2002; Practices, 2000).

Vor allem aber die relativ schlechte Verträglichkeit, die häufigen Boosterimpfungen sowie die herstellungsbedingten Schwankungen der Qualität limitieren die Verwendung des vorhandenen Impfstoffs (Leppla et al., 2002). Daher sind derzeit neue Impfstrategien gegen Milzbrand in der Entwicklung, um einen sicheren Schutz bei besserer Verträglichkeit und einfacherer Anwendung zu erreichen (Cybulski et al., 2009; Wang and Roehrl, 2005).

PA ist der zentrale Bestandteil des Anthrax-Toxins mit den Komponenten LeTx und EdTx (Collier and Young, 2003). Es ist auch der Kernbestandteil des aktuell in den USA verwendeten Impfstoffs AVA (Practices, 2000). AVA und den attenuierten Lebendimpfstoffen, die Louis Pasteur zuerst beschrieb (Pasteur et al., 1881b) und die später von Max Sterne zu dem heute noch im Veterinärbereich verwendeten Impfstoff weiterentwickelt wurden (Sterne, 1946), ist gemeinsam, dass sie eine Immunantwort gegen PA erzeugen und somit im Falle einer Infektion mit *B. anthracis* die Toxinwirkung neutralisiert werden kann. Auch der von uns beschriebene Impfstoff, basierend auf DNI – eine dominant negative PA-Mutante mit zwei ausgetauschten Aminosäuren – basiert auf dem Grundsatz, ähnlich wie AVA Antitoxin-Ak zu induzieren.

Damit DNI als sicherere Alternative zu PA in der Impfstoffherstellung dienen kann, muss die Antigenität, d. h. z. B. die Bildung von ausreichend spezifischen und schützenden Antikörpern und ein Boostereffekt mit der Ausbildung eines Immungedächtnisses, von DNI trotz der Mutationen in der Peptidsequenz mindestens gleichwertig mit PA sein. Wir konnten zeigen, dass DNI ausreichend Antikörper gegen PA induziert (Abbildung 5) und erfolgreich gegen eine normalerweise letale Injektion mit LeTx schützt (Tabelle 2). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die mit DNI geimpften Mäuse einen Anti-PA-Ak produzieren, der mit hoher Spezifität und Sensitivität an PA bindet (Abbildung 6).

5.1 DNI ist ein stärkeres Antigen als PA

Die starke Immunantwort nach Impfung mit DNI bei gleichzeitiger Beibehaltung der Spezifität der Antikörper für PA machen DNI als Antigen zur Impfstoffentwicklung als wirksame und sichere Alternative interessant. Darüber hinaus zeigte die Impfung mit DNI, verglichen mit PA, einen deutlich besseren Boostereffekt (Abbildung 5).

Während die Anti-PA-IgG Konzentration zwischen der zweiten und dritten Impfung mit PA nur um das 4,4-fache anstieg, konnte mit DNI ein 11,5-facher Anstieg der Antikörperkonzentration für dasselbe Intervall gezeigt werden. Dies ist vor allem von Bedeutung, wenn man bedenkt, dass der derzeit in den USA und Großbritannien lizenzierte Impfstoff AVA sechs Immunisierungen in den ersten 18 Monaten und anschließend jährliche Boosterimpfungen benötigt (Friesecke et al., 2007; Institute of Medicine (U.S.). Committee to Assess the Safety and Efficacy of the Anthrax Vaccine., 2002; Practices, 2000). Sollte dieser starke Boostereffekt von DNI auch bei der Immunisierung von Menschen bestehen, wären für einen ausreichenden Impfschutz unter Umständen weniger Injektionen nötig als bei dem PA basierendem AVA Impfstoff. Dies wäre ganz klar ein enormer Vorteil gegenüber AVA, denn weniger Injektionen führen zu einer höheren Compliance, weniger Nebenwirkungen und geringeren Kosten und Personalaufwand bei der Immunisierung (Chen and Orenstein, 1996).

Dass die Impfung mit DNI (sowohl als natives Protein, als auch als konjugierter Impfstoff mit PGA) signifikant höhere Antikörperkonzentrationen induziert hat, wirft natürlich die interessante Frage auf, auf welchem Mechanismus die verbesserte Immunantwort beruht. Wir möchten dazu zwei mögliche Mechanismen diskutieren. Zum einen könnten die Veränderungen in der Aminosäuresequenz eine Verbesserung bei der Präsentation durch Antigen präsentierende Zellen (APC) bewirken. Zum anderen könnte eine funktionelle Veränderung des DNI, nämlich die Blockierung einer Porenbildung in die Membran des Endosoms, zu einer effizienteren Antigenprozessierung führen.

5.1.1 Verändertes Peptidepitop?

PA besteht aus 735 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 83 kDa (Collier and Young, 2003). DNI ist eine PA Mutante mit zweifachem Aminosäurenaustausch: $\text{Lys}^{397} \rightarrow \text{Asp}^{397}$, $\text{Asp}^{425} \rightarrow \text{Lys}^{425}$ (Abbildung 10) (Sellman et al., 2001a; Sellman et al., 2001b). Eine mögliche Erklärung für die verbesserte Immunogenität ist, dass die beiden Mutationen im DNI Molekül eine Veränderung der Peptidepitope, die an den *Major Histocompatibility Complex* Klasse II (MHC II) und T-Zell Rezeptoren binden,

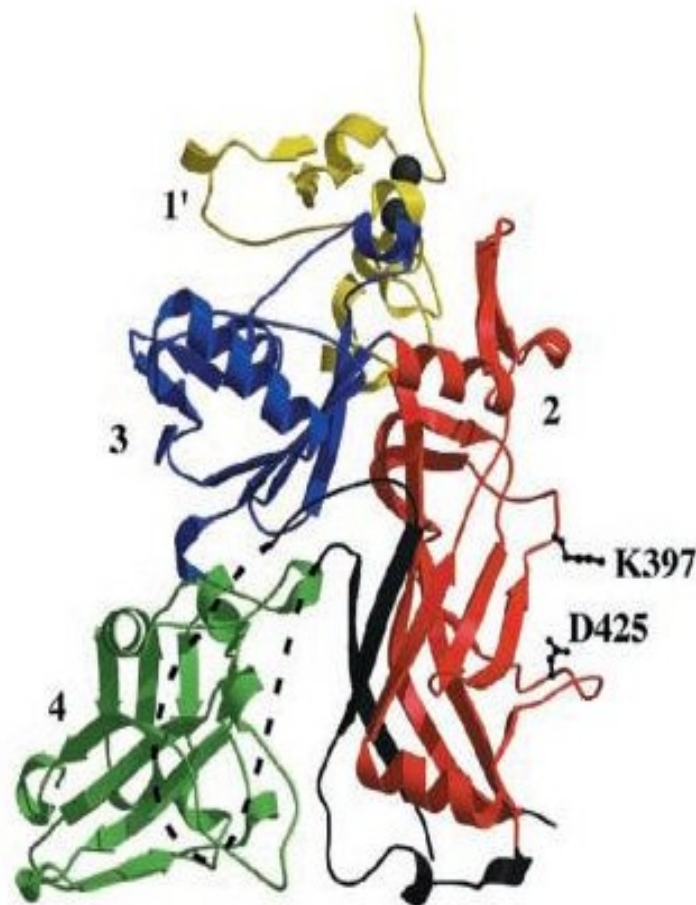


Abbildung 10: Darstellung des PA-Moleküls mit seinen 4 Domänen. Domäne 2 ist in rot abgebildet. Hervorgehoben sind die beiden Aminosäuren K397 und D425 im Bereich der β -barrel, durch deren Mutation die Porenbildung verhindert wird. Aus Sellman et al., JBC 2001.

bewirkt. Wenn man davon ausgeht, dass MHC II und T-Zell Rezeptoren vorwiegend Peptide mit einer Länge von zwölf Aminosäuren binden, würden die beiden Mutationen im PA Molekül theoretisch 24 unterschiedliche Epitope zwischen PA und DNI ergeben (Tabelle 3), welche sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Die Mutationen K397D und D425K vertauschen die Ladungen der Aminosäurereste an den Position 397 bzw. 425. Diese Veränderung der Ladung oder die spezifische Aminosäuresequenz könnte es den DNI-Fragmenten besser als den korrespondierenden PA-Fragmenten erlauben, in die Peptidbindungsstellen der MCH II-Moleküle zu passen. Solche DNI-Fragmente könnten in der Folge effektiver von den APC präsentiert werden und somit eine bessere Immunantwort bedingen.

Tabelle 3: Ladung der Peptidfragmente von DNI im Vergleich zu PA

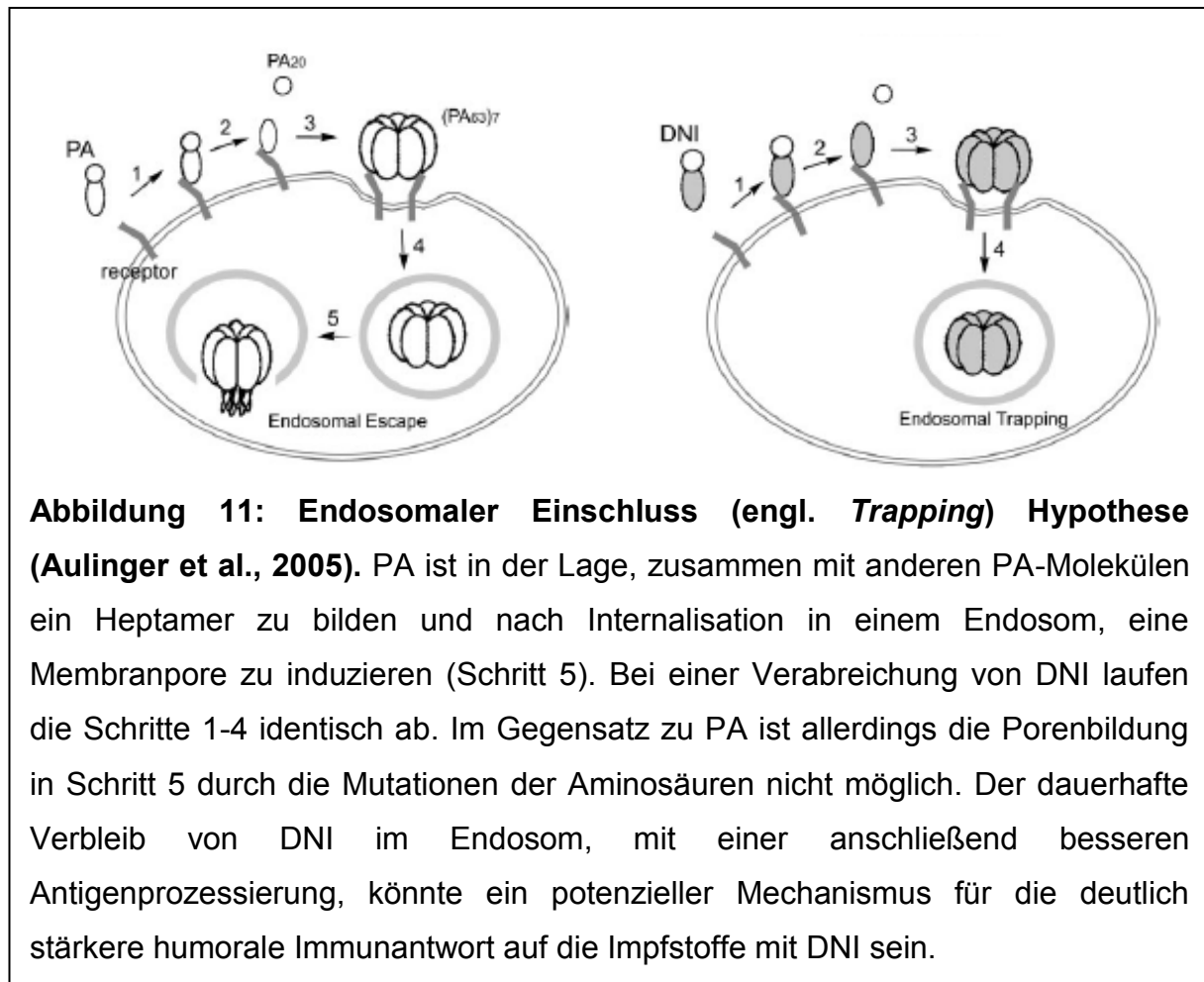
DNI Peptid mit D397	DNI Ladung	PA Ladung	DNI Peptid mit K425	DNI Ladung	PA Ladung
GKNQTLATIKAD	++-	+++	KNLAPIALNAQK	++	+-
KNQTLATIKADE	+++--	+++--	NLAPIALNAQKD	+-	--
NQTLATIKADEN	+++--	+++--	LAPIALNAQKDF	+-	--
QTLATIKADENQ	+++--	+++--	APIALNAQKDFS	+-	--
TLATIKADENQL	+++--	+++--	PIALNAQKDFS	+-	--
LATIKADENQLS	+++--	+++--	IALNAQKDFSST	+-	--
ATIKADENQLSQ	+++--	+++--	ALNAQKDFSSTP	+-	--
TIKADENQLSQI	+++--	+++--	LNAQKDFSSTPI	+-	--
IKADENQLSQIL	+++--	+++--	NAQKDFSSTPIT	+-	--
KADENQLSQILA	+++--	+++--	AQKDFSSTPITM	+-	--
ADENQLSQILAP	--	-+	QKDFSSTPITMN	+-	--
DENQLSQILAPN	--	-+	KDFSSTPITMNY	+-	--

DNI Sequenz: ³⁸⁶GKNQTLATIKADENQLSQILAPNNYYPSKNLAPIALNAQKDFSSTPITMNY⁴³⁶
 PA Sequenz: ³⁸⁶GKNQTLATIKAKENQLSQILAPNNYYPSKNLAPIALNAQDDFSSTPITMNY⁴³⁶

5.1.2 “Endosomaler Einschluss” und effektivere Antigenprozessierung von DNI?

Eine zweite mögliche Erklärung für die verbesserte Immunantwort auf DNI ist, dass DNI einer effektiveren Prozessierung durch die antigenpräsentierenden Immunzellen

verglichen mit PA unterliegt. Das PA Molekül unterzieht sich mehrerer Prozessierungen während des Intoxikationsprozesses wie im Abschnitt 1.4.3 und Abbildung 1 detailliert beschrieben und dargestellt ist (Young and Collier, 2007). Die vertauschten Aminosäuren K397D und D425K sind in Domäne 2, also der porenbildenden Domäne, lokalisiert (Mourez et al., 2003). Dort verhindern diese Mutationen die Konformationsänderung hin zur β -Barrel und damit die Ausbildung einer Pore in die Endosomenmembran (Sellman et al., 2001b). Im Folgenden wird dann die Translokation von LF und EF in das Zytosol und damit die toxische Wirkung auf die Wirtszelle verhindert (Sellman et al., 2001a; Sellman et al., 2001b). In den Endosomen der APC werden fremde Proteine prozessiert und die Antigenfragmente auf MHC II geladen und zur Präsentation an die Zelloberfläche transportiert. Es ist möglich, dass die durch PA induzierte Pore in der Endosomenmembran zu einem Funktionsverlust des Endosoms führt und somit zu einer Beeinträchtigung des endosomalen Transports und der Antigenpräsentation führt. Ebenfalls könnte die Veränderung des intraendosomalen pH-Wertes, die durch die Porenbildung von PA bedingt ist, die endosomale Funktion behindern. Darüber hinaus könnte das PA über die Porenbildung das Endosom verlassen bzw. ins Zytosol translozieren und sich somit der Antigenprozessierung und Präsentation entziehen. Da bei DNI Molekülen die Konformationsänderung hin zur Pore unterbunden ist (Nassi et al., 2002), könnte hier ein entscheidender Unterschied zu PA liegen, da DNI im Endosom eingeschlossen (engl. *trapped*) bleiben würde und somit der normalen endosomalen Prozessierung ausgesetzt wäre (Abbildung 11). Wäre ein solcher „endosomaler Einschluss“ Mechanismus für die stärkere Immunantwort des DNI verantwortlich, könnten auch in andere Toxine strategische Mutationen eingefügt werden, um deren Immunogenität zu verbessern.



Es sollte dabei angemerkt werden, dass beide Erklärungsversuche (Epitop-Hypothese, endosomaler Einschluss) lediglich spekulativ sind und weiterer experimenteller Untersuchungen bedürfen. Dennoch bestätigte eine weitere Studie mit DNI und anderen Funktionsverlust-Mutanten von PA eine erhöhte Immunantwort von DNI vs. PA in Mäusen. Zudem zeigte sich ein besseres Immungedächtnis nach 12 Monaten und ein höherer protektiver Titer gegen eine LeTx-Exposition (Yan et al., 2008). Eine weitere Studie bestätigte das Potenzial von verschiedenen dominant-negativen Inhibitoren des PA als Grundlage für einen Milzbrandimpfstoff (Cao et al., 2009).

Diese Ergebnisse zeigen, dass DNI sehr gut geeignet ist, Anti-PA-IgG Antikörper zu bilden. Dabei scheint DNI sogar noch ein potenteres Antigen als PA zu sein.

5.2 DNI ist ein guter Träger für Konjugat-Impfstoffe

PA-basierte Impfstoffe wie AVA oder auch rekombinantes PA induzieren Antikörper, die fast ausschließlich gegen PA und damit gegen das Milzbrandtoxin gerichtet sind. Solche Antikörper binden *in vivo* an die freigesetzten Toxine, nicht aber an *B. anthracis* oder dessen Sporen. Dabei besitzt *B. anthracis* neben dem Toxin noch eine Kapsel, die als unabhängiger Pathogenitätsfaktor bei einer Milzbrandinfektion eine wichtige Rolle spielt (Little and Ivins, 1999). Diese Kapsel aus γ -PGA schützt das Bakterium vor Phagozytose (Ezzell and Welkos, 1999) und verhindert so eine schnelle Elimination des Erregers, der somit ungehindert wachsen und sein letales Toxin freisetzen kann (Hanna, 1998). Die Kapsel und isolierte γ -PGA sind äußerst schwach immunogen und induzieren alleine keine ausreichenden und schützenden Antikörper (Roelants and Goodman, 1970). Mehrere Arbeiten beschreiben die Möglichkeit, γ -PGA an immunogene Proteine zu konjugieren, um somit die Immunogenität des Glutaminsäurepolymers zu verbessern (Chabot et al., 2004; Joyce et al., 2006; Rhie et al., 2003; Schneerson et al., 2003; Wang et al., 2004). Dieses Prinzip hat bereits breite Anwendung bei Impfstoffen gegen Erreger mit Polysaccharid-Kapseln wie z. B. *Haemophilus influenzae* b und Meningokokken gefunden. Die ansonsten schwach immunogenen Kapselbestandteile lösen nach Konjugation an ein Protein eine T-Zell-abhängige Immunreaktion aus, die höhere Antikörpertiter und ein Immungedächtnis induziert (Ada and Isaacs, 2003).

Wir haben in unserer Arbeitsgruppe bereits ein so genanntes „*dually active anthrax vaccine*“ (DAAV) entwickelt, in dem PGA über eine chemische Reaktion mit EDC an PA gebunden wurde. In dieser Arbeit hat sich nicht nur gezeigt, dass DAAV hohe Konzentrationen opsonisierender Antikörper gegen PGA und die Kapsel von *B. licheniformis* induzierte, sondern auch, dass es bezüglich der Immunogenität einen synergistischen Effekt zwischen PGA und PA gab (Rhie et al., 2003). Um die erhöhte

Immunogenität von DNI gegenüber PA auszunutzen, testeten wir, ob PGA konjugiert an DNI zumindest vergleichbare Antikörperkonzentrationen induzieren kann wie DAAV und somit DNI auch für einen konjugierten Impfstoff mit PGA eingesetzt werden kann.

Wir synthetisierten zwei konjugierte Impfstoffe (PGA-DNI und PGA-PA), indem wir analog zur Herstellung von DAAV eine Peptidbindung zwischen PGA und Lysinresten der Proteine PA und DNI herstellten (Rhie et al., 2003). Die verwendete PGA hatte eine Größe von ~10 kDa und wurde in einem Gewichtsverhältnis von 1:2 PGA zu Protein in die Reaktion eingebracht. Mit diesen beiden Konjugaten impften wir zwei Gruppen mit jeweils acht Mäusen parallel zu den anderen Gruppen. Dosis, Injektionsweg, Impfplan und Adjuvanz waren die gleichen wie bei den Gruppen PA und DNI. Die Serumproben wurden aus der Schwanzvene gewonnen und Antikörperkonzentrationen gegen PA und PGA mittels quantitativem ELISA gemessen.

Die beiden konjugierten Impfstoffe PGA-PA und PGA-DNI induzierten hohe IgG-Antikörperkonzentrationen sowohl gegen PA als auch gegen PGA. Auch hier bestätigte sich die Überlegenheit von DNI gegenüber PA in Bezug auf die Induktion von IgG-Ak. Die Gruppe der mit DNI-PGA geimpften Mäuse zeigte nicht nur signifikant höhere Anti-PA und Anti-PGA Antikörperkonzentrationen als die mit PA-PGA geimpften Mäuse, sondern auch wiederum einen besseren Boostereffekt zwischen der zweiten und dritten Immunisierung (11,4- vs. 6,3-facher Anstieg der Anti-PA-Ak und 10,2- vs. 5,7-facher Anstieg der Anti-PGA-Ak) (Abbildungen 7 und 8). Ebenfalls konnten wir analog zur Studie von Rhie et al. zeigen, dass der konjugierte Impfstoff aus PA bzw. DNI und PGA nicht nur zu einer messbaren Konzentration von Anti-PGA-Ak, die zumindest *in vitro* an *B. licheniformis* gebunden haben und eine

Zelltoxizität bewirkt haben (Rhie et al., 2003), sondern auch zu einer signifikanten Erhöhung der Anti-PA Antikörperkonzentrationen führte (Abbildung 9).

Unsere Ergebnisse lassen daher darauf schließen, dass DNI gut zur Verwendung eines konjugierten Impfstoffes geeignet ist. DNI ist erstens eine sicherere Alternative zu Impfstoffen, die auf PA basieren und zweitens ein potenter Träger für PGA, der dessen Immunogenität verstärkt.

5.3 Einsatz von DNI zur Postexpositionsprophylaxe

Im Gegensatz zu PA ist DNI kein natürlicher Bestandteil des Anthrax-Toxins und birgt daher auch nicht die Gefahr, im Falle einer Infektion mit *B. anthracis*, die Pathogenität der Erreger zu verstärken (Dixon et al., 1999). Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn man sich eine bioterroristische Attacke vorstellt, in der eine große Menge ungeschützter Zivilisten exponiert wurde. Einerseits möchte man hier vielleicht gefährdete Personen impfen (Brookmeyer et al., 2004), andererseits ist eine Impfung mit AVA eventuell nicht ausreichend sicher, falls eine bestehende Infektion nicht ausgeschlossen werden kann. Ferner wird die Impfung mit AVA vor allem bei Kindern nicht empfohlen (Ramasamy et al., 2010). Das amerikanische Center of Disease Control and Prevention (CDC) empfiehlt derzeit ein Regime mit 2x500 mg Ciprofloxacin p.o. für insgesamt 60 Tage und eine dreimalige Impfung mit AVA in 2-wöchentlichen Intervallen (Stern et al., 2008). Allerdings besteht in den USA aktuell für dieses Regime keine Zulassung durch die amerikanische Zulassungsbehörde (Food and Drug Administration, FDA) (Schneemann and Manchester, 2009). Da in Deutschland kein Impfstoff gegen Milzbrand zugelassen ist, besteht die Empfehlung der alleinigen Postexpositionsprophylaxe mit Ciprofloxacin (RKI, 2003). Eine interessante Analyse der Schutzwirkung durch die Antibiotikaprophylaxe wurde von Brookmeyer und Blades 2002 in Science

veröffentlicht. Unter den vermutlich 5 000-10 000 Patienten, die 2001 in den USA durch Milzbrandsporen-haltige Briefe exponiert wurden, habe die Antibiotikaprophylaxe wahrscheinlich eine Verdoppelung der fatalen Krankheitsverläufe verhindert (Brookmeyer and Blades, 2002). Auf der anderen Seite zeigte sich eine relativ schlechte Einnahmecompliance bei der Antibiotikatherapie von lediglich 44% der befragten Personen (Shepard et al., 2002; Williams et al., 2002). Weitere Nachteile der alleinigen Antibiotikaprophylaxe sind potenzielle Kontraindikationen für eine bestimmte Antibiotikatherapie (z. B. Kinder und Schwangere) sowie die Möglichkeit von Antibiotikaresistenzen, die ggf. auch absichtlich für eine bioterroristische Attacke induziert werden könnten (Schneemann and Manchester, 2009). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in manchen Fällen die Inkubationszeit für eine Milzbrandinfektion bis zu 43 Tage betragen kann (Meselson et al., 1994). Bei Primaten ist eine Persistenz der Sporen mit einer Inkubationszeit bis zu 90 Tagen möglich (Gleiser et al., 1963; Henderson et al., 1956). Dies bedeutet, dass die Inkubationszeit länger andauert als die empfohlene Antibiotikagabe. Daher würde DNI als möglicher Impfstoff, bei gleichzeitiger Antibiotikaprophylaxe, ein verzögertes Auftreten einer Milzbrandinfektion sicherer verhindern als die alleinige Chemoprophylaxe.

DNI hat neben dem hier gezeigten Potenzial zur Induktion von Anti-PA-Ak auch die Eigenschaft eines dominant negativen Inhibitors von PA des Anthrax-Toxins. Sellman entdeckte 2001, dass verschiedene Mutationen in der Domäne 2 des PA die Einschleusung von LF und EF in die Zelle verhindern (Sellman et al., 2001b). Einige dieser Mutanten bilden mit wtPA Heptamere und binden EF und/ oder LF. Dabei verhindert DNI den Transport der Toxine in das Zytoplasma und damit auch die toxische Wirkung (Mourez et al., 2003; Sellman et al., 2001a; Singh et al., 2001). Der für unseren Impfstoff verwendete DNI ist eine Doppelmutante mit zwei Punktmutationen

in der Domäne 2 und hat *in vivo* einen schützenden Effekt gegenüber einer letalen Intoxikation mit LeTx (Sellman et al., 2001a). Damit ist DNI nicht nur ein geeigneter Impfstoff, der Antikörper gegen PA induziert, sondern gleichzeitig auch ein Antitoxin, das als Wirkstoff bei einer systemischen Milzbrandinfektion eingesetzt werden kann. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund interessant, da im Falle einer Milzbrandinfektion, nur eine frühzeitige antibiotische Therapie während des Prodromalstadiums einen zumeist letalen Verlauf der Infektion verhindern kann (Dixon et al., 1999; Jernigan et al., 2001). Nach Ausbruch der Intoxikation des Wirtsorganismus ist eine antibiotische Therapie, auch zusammen mit einer optimalen supportiven Therapie, nur selten erfolgreich. Hier könnte die Antitoxinwirkung von DNI einen innovativen und wichtigen therapeutischen Ansatz darstellen.

Alternative Antitoxin-Therapien, v. a. mit monoklonalen Antikörpern gegen PA, sind derzeit in Entwicklung (Migone et al., 2009). Einige Therapien haben bereits Phase 1 klinischer Zulassungsstudien durchlaufen (Ramasamy et al., 2010; Schneemann and Manchester, 2009). Obwohl manche dieser Studien im Tiermodell eine Wirksamkeit in der Behandlung des Lungenmilzbrands zeigten, kann hier nicht von einer prophylaktischen Wirkung mit der Ausbildung von Anti-PA-Ak ausgegangen werden, wie sie in dieser Studie für DNI gezeigt wurde.

5.4 Limitationen der Studie

Die Hauptlimitation der Studie ist sicherlich, dass eine Infektion bzw. eine Exposition mit pathogenen Milzbrandstämmen nicht möglich ist. Aufgrund der hohen Sicherheitsvorkehrungen im Umgang mit pathogenen Milzbranderregeren sowie der Gefahr der Entwendung von potenziell gefährlichen Stoffen, ist in den USA die Verwendung von pathogenen *B. anthracis* Stämmen militärischen Forschungseinrichtungen vorbehalten. Dadurch war eine Testung des

Immunsystems über die humorale Abwehr hinaus in unserer Studie nur unzureichend möglich. Dabei ist davon auszugehen, dass die zelluläre Immunabwehr eine entscheidende Rolle in der Immunität gegen *B. anthracis* spielt (Sant and Yewdell, 2003; Tournier et al., 2009a). Dennoch gibt es neuere Studien, die Impfstoffe gegen PA und PGA mit pathogenen Milzbrandsporen untersuchten (Chabot et al., 2004; Joyce et al., 2006; Lee et al., 2009) und dabei zu ermutigenden Ergebnissen kamen. V. a. in der von Lee et al. publizierten Studie konnte bei Kaninchen und Meerschweinchen durch ein ähnliches Konjugat wie in dieser Studie ein protektiver Effekt gegen voll pathogene Anthraxsporen gezeigt werden. Die Studie von Chabot et al. in Mäusen zeigte ebenfalls eine gute Induktion von Anti-PGA-Ak, was jedoch nicht mit einem guten Überleben einer Milzbrandsporen-Exposition korrelierte. Hingegen konnte der von uns beschriebene Synergismus aus der Kombination von Kapsel und PA bestätigt werden. Zudem wurde ein besserer Schutz vor einer letalen Sporenexposition erreicht (Chabot et al., 2004). In der Studie von Joyce et al. wurde ein sehr guter Schutz durch den konjugierten Impfstoff erreicht, allerdings unter Verwendung eines anderen Syntheseverfahrens. Obwohl der von uns durchgeführte Expositionsversuch mit LeTx keine direkten Rückschlüsse auf die Wirksamkeit gegenüber einer letalen Exposition voll pathogener Anthraxsporen zulässt, sind die Ergebnisse, in Anbetracht der Publikationen mit pathogenen Sporen, ermutigend.

Eine weitere Limitation ist die Verwendung des Tiermodells. Mäuse sind generell das am besten geeignete Tiermodell für Immunisierungsstudien und Untersuchungen des humoralen Immunsystems (Mestas and Hughes, 2004). Allerdings lassen sich Mäuse im Gegensatz zu Kaninchen und Primaten schlecht gegen voll pathogene oder sogar unbekapselte, aber toxinproduzierende Stämme durch PA basierte Impfstoffe wie AVA schützen (Chabot et al., 2004; Welkos et al., 1986). Außerdem

sind Mäuse generell sehr anfällig für Milzbrand und LeTx (Goossens, 2009). Auf der anderen Seite sind grundlegende Experimente mit Kaninchen oder gar Primaten, sowohl ethisch als auch finanziell nicht zu vertreten. Zukünftige Studien sollten zeigen, ob auch in anderen Spezies mittels DNI Anti-PA-Ak erfolgreich induziert werden können und eine Exposition mit Milzbrandsporen überlebt wird. Sollte sich die verstärkte Antikörperantwort auf DNI auch in anderen Spezies behaupten, würde das die Entwicklung von DNI als Impfstoff entscheidend positiv beeinflussen.

Auch die Konjugationsmethode und die Bestimmung der Anti-PGA-Ak führen zu Limitationen in der Interpretation der Ergebnisse. In den publizierten Studien zu konjugierten, PGA-PA basierten Impfstoffen wurden zahlreiche, verschiedene chemische Methoden der Konjugation verwendet. Die Hauptfrage ist, ob die durch die kovalente Bindung entstandenen Epitope dabei entscheidend die Immunogenität der einzelnen Substanzen verändern (Joyce et al., 2006; Kubler-Kielb et al., 2006). Die durch Konjugation entstandenen Anti-PA-Ak binden jedoch weiterhin mit hoher Affinität an natives PA. Die Antikörperkonzentration ist dabei sogar noch erhöht (Abbildung 9), was gegen eine negative Auswirkung der Konjugationsmethode auf die Antikörperbildung gegen PA spricht. Hingegen werden die gebildeten Antikörper gegen PGA auch mittels eines Konjugats (BSA-PGA) im ELISA gemessen. Hier kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gemessenen Antikörper nicht an die native PGA binden, sondern an ein neues, unnatürliches Epitop, das durch EDC-Konjugation entstanden ist (Joyce et al., 2006). Hiergegen spricht jedoch der *in vitro* Nachweis von Antikörpern gegen die PGA-Kapsel von *B. licheniformis* sowie der positive Opsonophagozytose-Assay bei Rhie et al. (Rhie et al., 2003). Auch die weiteren Studien mit variablen Konjugationsverfahren haben zumeist *in vitro* antikapsuläre Effekte nachgewiesen (Schneerson et al., 2003; Wang et al., 2004).

6 Zusammenfassung

Die Milzbrandinfektion ist eine Zoonose, die durch das grampositive, sporenbildende Bakterium *B. anthracis* verursacht wird. Heute spielt sie in Industrienationen wie Deutschland und den USA v. a. aufgrund einer möglichen Bedrohung durch den Bioterrorismus und der biologischen Kriegsführung eine wichtige Rolle. Obwohl erste Impfstoffe gegen *B. anthracis* bereits Mitte des 19. Jh. entwickelt wurden und breite Verwendung in der Tierhaltung gefunden haben, stehen derzeit nur unbefriedigende Impfstoffe zur Immunisierung des Menschen zur Verfügung. Daher war es Ziel dieser Studie eine Mutante (DNI) des Milzbrand-Toxin-Bestandteils *Protective Antigen* (PA) mit dominant-negativ inhibitorischer Eigenschaft an den Milzbrandrezeptoren ANT XR-1 und ANT XR-2, als Antigen für zukünftige Milzbrandvakzine zu testen.

Hierzu wurden BALB/c Mäuse mit verschiedenen Impfpräparaten geimpft und anschließend die Antikörperkonzentration gegen PA im Serum bestimmt. Untersucht wurden neben der Immunisierung mit den nativen Proteinen PA und DNI auch zwei so genannte konjugierte Impfstoffe. Hierbei wurde PGA, aus dem die Kapsel des *B. anthracis* gebildet ist, kovalent an PA bzw. DNI gebunden, und der so hergestellte Impfstoff verabreicht. Getestet wurden neben der Antikörperkonzentration gegen PA auch Antikörper gegen die PGA der Kapsel. Ebenfalls wurde das Überleben einer Injektion mit tödlicher Milzbrandtoxindosis getestet.

Es konnte gezeigt werden, dass DNI ein potentes Antigen ist und ausreichend schützende Antikörper gegen PA induziert. Dabei wiesen die mit DNI und DNI-PGA geimpften Mäuse signifikant höhere Anti-PA-IgG-Konzentrationen auf, als die mit PA bzw. PA-PGA immunisierten Kontrolltiere. Ebenfalls zeigten die beiden Gruppen mit den konjugierten Impfstoffen ausreichend hohe Antikapsuläre-Antikörper gegen

PGA. Darüber hinaus überlebten alle Tiere, die mit PA oder DNI geimpft wurden, die Toxingabe, wohingegen ungeschützte Mäuse ausnahmslos starben.

Neben der protektiven Immunantwort nach DNI-Impfung ist auch die Antitoxineigenschaft, aufgrund der dominant-negativen inhibitorischen Aktivität von DNI, klinisch relevant. V. a. bei der Verwendung als Postexpositionsprophylaxe ermöglichen hier das erhöhte Sicherheitsprofil von DNI gegenüber PA sowie die gleichzeitige Immunisierung mit der Anti-Toxin-Eigenschaft einen interessanten Ansatz. Daher scheint DNI ein aussichtsreicher Kandidat für weitere Impfstoffentwicklungen gegen *B. anthracis* zu sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden 2005 publiziert (siehe Seite 92).

7 Literatur

Abrami, L., Bischofberger, M., Kunz, B., Groux, R., and van der Goot, F.G. (2010). Endocytosis of the anthrax toxin is mediated by clathrin, actin and unconventional adaptors. *PLoS Pathog* 6, e1000792.

Abrami, L., Leppla, S.H., and van der Goot, F.G. (2006). Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis. *J Cell Biol* 172, 309-320.

Abrami, L., Lindsay, M., Parton, R.G., Leppla, S.H., and van der Goot, F.G. (2004). Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. *J Cell Biol* 166, 645-651.

Abramova, F.A., Grinberg, L.M., Yampolskaya, O.V., and Walker, D.H. (1993). Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 2291-2294.

Ada, G., and Isaacs, D. (2003). Carbohydrate-protein conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect* 9, 79-85.

Agrawal, A., Lingappa, J., Leppla, S.H., Agrawal, S., Jabbar, A., Quinn, C., and Pulendran, B. (2003). Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. *Nature* 424, 329-334.

Aldhous, P. (1990). Biological warfare. Gruinard Island handed back. *Nature* 344, 801.

Aulinger, B.A., Roehrl, M.H., Mekalanos, J.J., Collier, R.J., and Wang, J.Y. (2005). Combining anthrax vaccine and therapy: a dominant-negative inhibitor of anthrax toxin is also a potent and safe immunogen for vaccines. *Infection and immunity* 73, 3408-3414.

Baker, P.J. (1992). T cell regulation of the antibody response to bacterial polysaccharide antigens: an examination of some general characteristics and their implications. *The Journal of infectious diseases* 165 Suppl 1, S44-48.

Bankl, H. (2001). [Anthrax. History of a public health threat]. *Wien Klin Wochenschr* 113, 895-898.

Bauminger, S., and Wilchek, M. (1980). The use of carbodiimides in the preparation of immunizing conjugates. *Methods Enzymol* 70, 151-159.

Benson, E.L., Huynh, P.D., Finkelstein, A., and Collier, R.J. (1998). Identification of residues lining the anthrax protective antigen channel. *Biochemistry* 37, 3941-3948.

Bernard, H., Faber, M., Grunow, R., Bochat, V., and Görg, A. (2010). Drogenkonsum: *Bacillus anthracis* in Heroin? *Dtsch Arztebl* 107, 807-.

Birrer, G.A., Cromwick, A.M., and Gross, R.A. (1994). Gamma-poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physiological and biochemical studies. *International journal of biological macromolecules* 16, 265-275.

Borio, L., Frank, D., Mani, V., Chiriboga, C., Pollanen, M., Ripple, M., Ali, S., DiAngelo, C., Lee, J., Arden, J., *et al.* (2001). Death due to bioterrorism-related inhalational anthrax: report of 2 patients. *Jama* 286, 2554-2559.

Bozue, J.A., Parthasarathy, N., Phillips, L.R., Cote, C.K., Fellows, P.F., Mendelson, I., Shafferman, A., and Friedlander, A.M. (2005). Construction of a rhamnose mutation in *Bacillus anthracis* affects adherence to macrophages but not virulence in guinea pigs. *Microb Pathog* 38, 1-12.

Bradley, K.A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R.J., and Young, J.A. (2001). Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414, 225-229.

Brookmeyer, R., and Blades, N. (2002). Prevention of inhalational anthrax in the U.S. outbreak. *Science (New York, NY)* 295, 1861.

Brookmeyer, R., Johnson, E., and Bollinger, R. (2004). Public health vaccination policies for containing an anthrax outbreak. *Nature* 432, 901-904.

Bush, L.M., Abrams, B.H., Beall, A., and Johnson, C.C. (2001). Index case of fatal inhalational anthrax due to bioterrorism in the United States. *N Engl J Med* 345, 1607-1610.

Campbell, J.D., Clement, K.H., Wasserman, S.S., Donegan, S., Chrisley, L., and Kotloff, K.L. (2007). Safety, reactogenicity and immunogenicity of a recombinant protective antigen anthrax vaccine given to healthy adults. *Hum Vaccin* 3, 205-211.

Cao, S., Guo, A., Liu, Z., Tan, Y., Wu, G., Zhang, C., Zhao, Y., and Chen, H. (2009). Investigation of new dominant-negative inhibitors of anthrax protective antigen mutants for use in therapy and vaccination. *Infection and immunity* 77, 4679-4687.

CDC (2001a). From the Centers for Disease Control and Prevention. Considerations for distinguishing influenza-like illness from inhalational anthrax. *Jama* 286, 2537-2539.

CDC (2001b). From the Centers for Disease Control and Prevention. Investigation of bioterrorism-related anthrax, 2001. *Jama* 286, 2662-2663.

Chabot, D.J., Scorpio, A., Tobery, S.A., Little, S.F., Norris, S.L., and Friedlander, A.M. (2004). Anthrax capsule vaccine protects against experimental infection. *Vaccine* 23, 43-47.

Chen, R.T., and Orenstein, W.A. (1996). Epidemiologic methods in immunization programs. *Epidemiol Rev* 18, 99-117.

Collier, R.J., and Young, J.A. (2003). Anthrax toxin. *Annual review of cell and developmental biology* 19, 45-70.

Communities, C.o.t.E. (2003). Communication from the Commission to the Council and the European Parliament on cooperation in the European Union on preparedness and response to Biological and Chemical agent attacks (Health security) (Brussels).

Cui, X., Moayeri, M., Li, Y., Li, X., Haley, M., Fitz, Y., Correa-Araujo, R., Banks, S.M., Leppla, S.H., and Eichacker, P.Q. (2004). Lethality during continuous anthrax lethal toxin infusion is associated with circulatory shock but not inflammatory cytokine or nitric oxide release in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R699-709.

Cunningham, K., Lacy, D.B., Mogridge, J., and Collier, R.J. (2002). Mapping the lethal factor and edema factor binding sites on oligomeric anthrax protective antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7049-7053.

Cybulski, R.J., Jr., Sanz, P., and O'Brien, A.D. (2009). Anthrax vaccination strategies. *Molecular aspects of medicine* 30, 490-502.

Dance, A. (2008). Death renews biosecurity debate. *Nature* 454, 672.

Davaine, C. (1863). Recherche sur les infusoires du sang dans la maladie connue sous le nom de sang de rate. *CR Acad Sci* 67, 220-223.

Dirckx, J.H. (1981). Virgil on anthrax. *Am J Dermatopathol* 3, 191-195.

Dixon, T.C., Meselson, M., Guillemin, J., and Hanna, P.C. (1999). Anthrax. *N Engl J Med* 341, 815-826.

Driks, A. (1999). *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 1-20.

Driks, A. (2009). The *Bacillus anthracis* spore. *Molecular aspects of medicine* 30, 368-373.

Druett, H.A., Henderson, D.W., Packman, L., and Peacock, S. (1953). Studies on respiratory infection. I. The influence of particle size on respiratory infection with anthrax spores. *J Hyg (Lond)* 51, 359-371.

Duesbery, N.S., Webb, C.P., Leppla, S.H., Gordon, V.M., Klimpel, K.R., Copeland, T.D., Ahn, N.G., Oskarsson, M.K., Fukasawa, K., Paull, K.D., *et al.* (1998). Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science (New York, NY)* 280, 734-737.

Enserink, M., and Bhattacharjee, Y. (2008). Bioterrorism. Scientists seek answers, ponder future after anthrax case suicide. *Science (New York, NY)* 321, 754-755.

Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* 1, 117-126.

Ezzell, J.W., and Welkos, S.L. (1999). The capsule of *Bacillus anthracis*, a review. *Journal of applied microbiology* 87, 250.

Fang, H., Cordoba-Rodriguez, R., Lankford, C.S., and Frucht, D.M. (2005). Anthrax lethal toxin blocks MAPK kinase-dependent IL-2 production in CD4⁺ T cells. *J Immunol* 174, 4966-4971.

Fang, H., Xu, L., Chen, T.Y., Cyr, J.M., and Frucht, D.M. (2006). Anthrax lethal toxin has direct and potent inhibitory effects on B cell proliferation and immunoglobulin production. *J Immunol* 176, 6155-6161.

Firoved, A.M., Miller, G.F., Moayeri, M., Kakkar, R., Shen, Y., Wiggins, J.F., McNally, E.M., Tang, W.J., and Leppla, S.H. (2005). *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. *Am J Pathol* 167, 1309-1320.

Firoved, A.M., Moayeri, M., Wiggins, J.F., Shen, Y., Tang, W.J., and Leppla, S.H. (2007). Anthrax edema toxin sensitizes DBA/2J mice to lethal toxin. *Infection and immunity* 75, 2120-2125.

Fouet, A. (2009). The surface of *Bacillus anthracis*. *Molecular aspects of medicine* 30, 374-385.

Fouet, A., and Mock, M. (2006). Regulatory networks for virulence and persistence of *Bacillus anthracis*. *Current opinion in microbiology* 9, 160-166.

Franz, D.R. (2009). Preparedness for an anthrax attack. *Molecular aspects of medicine* 30, 503-510.

Friedlander, A.M. (1986). Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *The Journal of biological chemistry* 261, 7123-7126.

Friedlander, A.M., and Little, S.F. (2009). Advances in the development of next-generation anthrax vaccines. *Vaccine* 27 Suppl 4, D28-32.

Friedlander, A.M., Pittman, P.R., and Parker, G.W. (1999). Anthrax vaccine: evidence for safety and efficacy against inhalational anthrax. *Jama* 282, 2104-2106.

Friedlander, A.M., Welkos, S.L., and Ivins, B.E. (2002). Anthrax vaccines. *Current topics in microbiology and immunology* 271, 33-60.

Friesecke, I., Biederbick, W., Boecken, G., Gottschalk, R., Koch, H.-U., Peters, G., Peters, S., Sasse, J., and Stich, A. (2007). Anthrax. In *Biologische Gefahren II* (Bonn), pp. 98-111.

Giorno, R., Bozue, J., Cote, C., Wenzel, T., Moody, K.S., Mallozzi, M., Ryan, M., Wang, R., Zielke, R., Maddock, J.R., *et al.* (2007). Morphogenesis of the *Bacillus anthracis* spore. *J Bacteriol* 189, 691-705.

Gladstone, G.P. (1954). ANTHRAX PROTECTIVE ANTIGEN. *Br Med J* 1, 1263-1264.

Gleiser, C.A., Berdjis, C.C., Hartman, H.A., and Gochenour, W.S. (1963). Pathology of Experimental Respiratory Anthrax in *Macaca Mulatta*. *Br J Exp Pathol* 44, 416-426.

Goldblatt, D. (2000). Conjugate vaccines. *Clin Exp Immunol* 119, 1-3.

Goossens, P.L. (2009). Animal models of human anthrax: the Quest for the Holy Grail. *Molecular aspects of medicine* 30, 467-480.

Gorse, G.J., Keitel, W., Keyserling, H., Taylor, D.N., Lock, M., Alves, K., Kenner, J., Deans, L., and Gurwith, M. (2006). Immunogenicity and tolerance of ascending doses of a recombinant protective antigen (rPA102) anthrax vaccine: a randomized, double-blinded, controlled, multicenter trial. *Vaccine* 24, 5950-5959.

Greenberg, D.S. (2001). US anthrax scares prompt action on bioterrorism. *Lancet* 358, 1435.

Grossman, A.D. (1995). Genetic networks controlling the initiation of sporulation and the development of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* 29, 477-508.

Gupta, P.K., Moayeri, M., Crown, D., Fattah, R.J., and Leppla, S.H. (2008). Role of N-terminal amino acids in the potency of anthrax lethal factor. *PLoS One* 3, e3130.

Ha, S.D., Ham, B., Mogridge, J., Saftig, P., Lin, S., and Kim, S.O. (2010). Cathepsin B-mediated autophagy flux facilitates the anthrax toxin receptor 2-mediated delivery of anthrax lethal factor into the cytoplasm. *The Journal of biological chemistry* 285, 2120-2129.

Hanna, P. (1998). Anthrax pathogenesis and host response. *Current topics in microbiology and immunology* 225, 13-35.

Hanna, P.C., Acosta, D., and Collier, R.J. (1993). On the role of macrophages in anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 10198-10201.

Heesemann, J. (2007). Vorwort der Fachgesellschaften - Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). In *Biologische Gefahren II, B.f.B.u. Katastrophenhilfe*, ed. (Bonn), pp. 17-18.

Henderson, D.W., Peacock, S., and Belton, F.C. (1956). Observations on the prophylaxis of experimental pulmonary anthrax in the monkey. *J Hyg (Lond)* 54, 28-36.

Hoch, J.A. (1993). Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual review of microbiology* 47, 441-465.

Hong, J., Doebele, R.C., Lingen, M.W., Quilliam, L.A., Tang, W.J., and Rosner, M.R. (2007). Anthrax edema toxin inhibits endothelial cell chemotaxis via Epac and Rap1. *The Journal of biological chemistry* 282, 19781-19787.

Institute of Medicine (U.S.). Committee to Assess the Safety and Efficacy of the Anthrax Vaccine. (2002). *The anthrax vaccine : is it safe? does it work?* (Washington, D.C., National Academy Press).

Jay, V. (2001). The legacy of Robert Koch. *Arch Pathol Lab Med* 125, 1148-1149.

Jernigan, J.A., Stephens, D.S., Ashford, D.A., Omenaca, C., Topiel, M.S., Galbraith, M., Tapper, M., Fisk, T.L., Zaki, S., Popovic, T., *et al.* (2001). Bioterrorism-related

inhalational anthrax: the first 10 cases reported in the United States. *Emerg Infect Dis* 7, 933-944.

Joyce, J., Cook, J., Chabot, D., Hepler, R., Shoop, W., Xu, Q., Stambaugh, T., Aste-Amezaga, M., Wang, S., Indrawati, L., *et al.* (2006). Immunogenicity and protective efficacy of *Bacillus anthracis* poly-gamma-D-glutamic acid capsule covalently coupled to a protein carrier using a novel triazine-based conjugation strategy. *The Journal of biological chemistry* 281, 4831-4843.

Kanafani, Z.A., Ghossain, A., Sharara, A.I., Hatem, J.M., and Kanj, S.S. (2003). Endemic gastrointestinal anthrax in 1960s Lebanon: clinical manifestations and surgical findings. *Emerg Infect Dis* 9, 520-525.

Klimpel, K.R., Molloy, S.S., Thomas, G., and Leppla, S.H. (1992). Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10277-10281.

Koch, R. (1876). Die Ätiologie der Milzbrandkrankheit, begründet auf der Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis* Cohns Beitr Biol Pflanzen 2.

Koehler, T.M. (2002). *Bacillus anthracis* genetics and virulence gene regulation. *Current topics in microbiology and immunology* 271, 143-164.

Koehler, T.M. (2009). *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Molecular aspects of medicine* 30, 386-396.

Kolsto, A.B., Tourasse, N.J., and Okstad, O.A. (2009). What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annual review of microbiology* 63, 451-476.

König, H., and Niemetz, R. (1997). Polyglutamate surface polypeptides in Bacteria and Archea. *FEMS Microbiol Rev* 20, 36-39.

Krantz, B.A., Melnyk, R.A., Zhang, S., Juris, S.J., Lacy, D.B., Wu, Z., Finkelstein, A., and Collier, R.J. (2005). A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin pore. *Science (New York, NY)* 309, 777-781.

Kubler-Kielb, J., Liu, T.Y., Mocca, C., Majadly, F., Robbins, J.B., and Schneerson, R. (2006). Additional conjugation methods and immunogenicity of *Bacillus anthracis* poly-gamma-D-glutamic acid-protein conjugates. *Infection and immunity* 74, 4744-4749.

Kubota, H., Nambu, Y., and Endo, T. (1996). Alkaline hydrolysis of poly(gamma-glutamic acid) produced by microorganism. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* 34, 1347-1351.

Kuo, S.R., Willingham, M.C., Bour, S.H., Andreas, E.A., Park, S.K., Jackson, C., Duesbery, N.S., Leppla, S.H., Tang, W.J., and Frankel, A.E. (2008). Anthrax toxin-induced shock in rats is associated with pulmonary edema and hemorrhage. *Microb Pathog* 44, 467-472.

Lacy, D.B., and Collier, R.J. (2002). Structure and function of anthrax toxin. *Current topics in microbiology and immunology* 271, 61-85.

Lacy, D.B., Wigelsworth, D.J., Melnyk, R.A., Harrison, S.C., and Collier, R.J. (2004a). Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: a role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13147-13151.

Lacy, D.B., Wigelsworth, D.J., Scobie, H.M., Young, J.A., and Collier, R.J. (2004b). Crystal structure of the von Willebrand factor A domain of human capillary morphogenesis protein 2: an anthrax toxin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 6367-6372.

Lee, D.Y., Chun, J.H., Ha, H.J., Park, J., Kim, B.S., Oh, H.B., and Rhie, G.E. (2009). Poly-gamma-d-glutamic acid and protective antigen conjugate vaccines induce functional antibodies against the protective antigen and capsule of *Bacillus anthracis* in guinea-pigs and rabbits. *FEMS Immunol Med Microbiol* 57, 165-172.

Leppla, S.H. (1982). Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eukaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 3162-3166.

Leppla, S.H., Robbins, J.B., Schneerson, R., and Shiloach, J. (2002). Development of an improved vaccine for anthrax. *J Clin Invest* 110, 141-144.

Little, S.F., and Ivins, B.E. (1999). Molecular pathogenesis of *Bacillus anthracis* infection. *Microbes Infect* 1, 131-139.

Liu, S., and Leppla, S.H. (2003). Cell surface tumor endothelium marker 8 cytoplasmic tail-independent anthrax toxin binding, proteolytic processing, oligomer formation, and internalization. *The Journal of biological chemistry* 278, 5227-5234.

M'Fadyean, J. (1903). A further note with regard to the staining reaction of anthrax blood with methylene blue. *Journal of Comparative Pathology* 16, 360-361.

Makela, P.H., Sibakov, M., Herva, E., Henrichsen, J., Luotonen, J., Timonen, M., Leinonen, M., Koskela, M., Pukander, J., Pontynen, S., *et al.* (1980). Pneumococcal vaccine and otitis media. *Lancet* 2, 547-551.

Manchee, R.J., Broster, M.G., Anderson, I.S., Henstridge, R.M., and Melling, J. (1983). Decontamination of *Bacillus anthracis* on Gruinard Island? *Nature* 303, 239-240.

Manchee, R.J., Broster, M.G., Melling, J., Henstridge, R.M., and Stagg, A.J. (1981). *Bacillus anthracis* on Gruinard Island. *Nature* 294, 254-255.

Meselson, M., Guillemin, J., Hugh-Jones, M., Langmuir, A., Popova, I., Shelokov, A., and Yampolskaya, O. (1994). The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science* (New York, NY) 266, 1202-1208.

Mestas, J., and Hughes, C.C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172, 2731-2738.

Migone, T.S., Subramanian, G.M., Zhong, J., Healey, L.M., Corey, A., Devalaraja, M., Lo, L., Ullrich, S., Zimmerman, J., Chen, A., *et al.* (2009). Raxibacumab for the treatment of inhalational anthrax. *N Engl J Med* 361, 135-144.

Mikesell, P., Ivins, B.E., Ristoph, J.D., and Dreier, T.M. (1983). Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*. *Infection and immunity* 39, 371-376.

Moayeri, M., Haines, D., Young, H.A., and Leppla, S.H. (2003). *Bacillus anthracis* lethal toxin induces TNF-alpha-independent hypoxia-mediated toxicity in mice. *J Clin Invest* 112, 670-682.

Moayeri, M., and Leppla, S.H. (2009). Cellular and systemic effects of anthrax lethal toxin and edema toxin. *Molecular aspects of medicine* 30, 439-455.

Mock, M., and Fouet, A. (2001). Anthrax. *Annual review of microbiology* 55, 647-671.

Mogridge, J., Cunningham, K., Lacy, D.B., Mourez, M., and Collier, R.J. (2002). The lethal and edema factors of anthrax toxin bind only to oligomeric forms of the protective antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7045-7048.

Molloy, S.S., Bresnahan, P.A., Leppla, S.H., Klimpel, K.R., and Thomas, G. (1992). Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the

sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. The Journal of biological chemistry 267, 16396-16402.

Mourez, M., Yan, M., Lacy, D.B., Dillon, L., Bentsen, L., Marpoe, A., Maurin, C., Hotze, E., Wigelsworth, D., Pimental, R.A., *et al.* (2003). Mapping dominant-negative mutations of anthrax protective antigen by scanning mutagenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 13803-13808.

Nabel, G.J. (2009). Protecting against future shock--inhalational anthrax. N Engl J Med 361, 191-193.

Nassi, S., Collier, R.J., and Finkelstein, A. (2002). PA63 channel of anthrax toxin: an extended beta-barrel. Biochemistry 41, 1445-1450.

Oppermann-Sanio, F.B., and Steinbuchel, A. (2002). Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. Naturwissenschaften 89, 11-22.

Ostroff, G., Axelrod, D.R., and Bovarnick, M. (1958). ANTIGENICITY OF POLYMERS OF GLUTAMYL PEPTIDE IN HUMANS. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 99, 345-347.

Paccani, S.R., Tonello, F., Ghittoni, R., Natale, M., Muraro, L., D'Elios, M.M., Tang, W.J., Montecucco, C., and Baldari, C.T. (2005). Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling. J Exp Med 201, 325-331.

Park, J.M., Greten, F.R., Li, Z.W., and Karin, M. (2002). Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. Science (New York, NY 297, 2048-2051.

Pasteur, L., Chamberland, C., and Roux, E. (1881a). Compte Rendu sommaire des experiences faites à Pouilly-le-Fort, près de Melun, sur la vaccination charbonneuse. CR Acad Sci 92, 1393-1398.

Pasteur, L., Chamberland, C., and Roux, E. (1881b). Le vaccin du charbon. CR Acad Sci 92, 666-668.

Peltola, H., Kayhty, H., Sivonen, A., and Makela, H. (1977). Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double-blind field study of 100,000 vaccinees 3 months to 5 years of age in Finland. Pediatrics 60, 730-737.

Perez-Camero, G., Congregado, F., Bou, J.J., and Munoz-Guerra, S. (1999). Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly(gamma-glutamic acid). *Biotechnol Bioeng* 63, 110-115.

Petosa, C., Collier, R.J., Klimpel, K.R., Leppla, S.H., and Liddington, R.C. (1997). Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature* 385, 833-838.

Pimental, R.A., Christensen, K.A., Krantz, B.A., and Collier, R.J. (2004). Anthrax toxin complexes: heptameric protective antigen can bind lethal factor and edema factor simultaneously. *Biochemical and biophysical research communications* 322, 258-262.

Practices, A.C.o.I. (2000). Use of anthrax vaccine in the United States. *MMWR Recomm Rep* 49, 1-20.

Preis, H. (1909). Experimentelle Studien über Virulenz, Empfänglichkeit und Immunität beim Milzbrand. *Zeitr Immunität-Forsch* 5, 641-452.

Price, B.M., Liner, A.L., Park, S., Leppla, S.H., Mateczun, A., and Galloway, D.R. (2001). Protection against anthrax lethal toxin challenge by genetic immunization with a plasmid encoding the lethal factor protein. *Infection and immunity* 69, 4509-4515.

Puhar, A., and Montecucco, C. (2007). Where and how do anthrax toxins exit endosomes to intoxicate host cells? *Trends Microbiol* 15, 477-482.

Qa'dan, M., Christensen, K.A., Zhang, L., Roberts, T.M., and Collier, R.J. (2005). Membrane insertion by anthrax protective antigen in cultured cells. *Molecular and cellular biology* 25, 5492-5498.

Quesnel-Hellmann, A., Cleret, A., Vidal, D.R., and Tournier, J.N. (2006). Evidence for adjuvanticity of anthrax edema toxin. *Vaccine* 24, 699-702.

Quinn, C., and Turnbull, P. (1998). Anthrax. In *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infection*, W. Hausler, and M. Sussman, eds. (London, Edward Arnold), p. 799.

Rainey, G.J., Wigelsworth, D.J., Ryan, P.L., Scobie, H.M., Collier, R.J., and Young, J.A. (2005). Receptor-specific requirements for anthrax toxin delivery into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13278-13283.

Ramasamy, S., Liu, C.Q., Tran, H., Gubala, A., Gauci, P., McAllister, J., and Vo, T. (2010). Principles of antidote pharmacology: an update on prophylaxis, post-

exposure treatment recommendations and research initiatives for biological agents. *Br J Pharmacol* 161, 721-748.

Rangel, R.A., and Gonzalez, D.A. (1975). *Bacillus anthracis* meningitis. *Neurology* 25, 525-530.

Rhie, G.E., Roehrl, M.H., Mourez, M., Collier, R.J., Mekalanos, J.J., and Wang, J.Y. (2003). A dually active anthrax vaccine that confers protection against both bacilli and toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 10925-10930.

RKI (2000). Zu Milzbrandausbrüchen im Sommer 2000 in der WHO-Region Europa. *Epidemiologisches Bulletin* 41, 330-331.

RKI (2003). RKI-Merkblatt Milzbrand (Anthrax). *Bundesgesundheitsblatt*.

RKI (2010a). Information für Drogenkonsumenten. Informationsblatt des Robert-Koch-Instituts zu Milzbrand (Anthrax) für Drogenkonsumenten.

RKI (2010b). Kutaner Milzbrand nach intravenösem Heroinabusus. *Epidemiologisches Bulletin* 2, 15.

Roelants, G.E., and Goodman, J.W. (1970). Tolerance induction by an apparently non-immunogenic molecule. *Nature* 227, 175-176.

Rosovitz, M.J., Schuck, P., Varughese, M., Chopra, A.P., Mehra, V., Singh, Y., McGinnis, L.M., and Leppla, S.H. (2003). Alanine-scanning mutations in domain 4 of anthrax toxin protective antigen reveal residues important for binding to the cellular receptor and to a neutralizing monoclonal antibody. *The Journal of biological chemistry* 278, 30936-30944.

Rossi Paccani, S., Tonello, F., Patrussi, L., Capitani, N., Simonato, M., Montecucco, C., and Baldari, C.T. (2007). Anthrax toxins inhibit immune cell chemotaxis by perturbing chemokine receptor signalling. *Cell Microbiol* 9, 924-929.

Sant, A., and Yewdell, J. (2003). Antigen processing and recognition. *Curr Opin Immunol* 15, 66-68.

Santelli, E., Bankston, L.A., Leppla, S.H., and Liddington, R.C. (2004). Crystal structure of a complex between anthrax toxin and its host cell receptor. *Nature* 430, 905-908.

Schneemann, A., and Manchester, M. (2009). Anti-toxin antibodies in prophylaxis and treatment of inhalation anthrax. *Future Microbiol* 4, 35-43.

Schneerson, R., Kubler-Kielb, J., Liu, T.Y., Dai, Z.D., Leppla, S.H., Yergey, A., Backlund, P., Shiloach, J., Majadly, F., and Robbins, J.B. (2003). Poly(gamma-D-glutamic acid) protein conjugates induce IgG antibodies in mice to the capsule of *Bacillus anthracis*: a potential addition to the anthrax vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 8945-8950.

Schwartz, M. (2009). Dr. Jekyll and Mr. Hyde: a short history of anthrax. *Molecular aspects of medicine* 30, 347-355.

Scobie, H.M., Rainey, G.J., Bradley, K.A., and Young, J.A. (2003). Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 5170-5174.

Sellman, B.R., Mourez, M., and Collier, R.J. (2001a). Dominant-negative mutants of a toxin subunit: an approach to therapy of anthrax. *Science (New York, NY)* 292, 695-697.

Sellman, B.R., Nassi, S., and Collier, R.J. (2001b). Point mutations in anthrax protective antigen that block translocation. *The Journal of biological chemistry* 276, 8371-8376.

Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current opinion in microbiology* 6, 550-556.

Setlow, P. (2007). I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends Microbiol* 15, 172-180.

Sheehan, J.C., and Hess, G.P. (1955). A NEW METHOD OF FORMING PEPTIDE BONDS. *J Am Chem Soc* 77, 1067-1068.

Shepard, C.W., Soriano-Gabarro, M., Zell, E.R., Hayslett, J., Lukacs, S., Goldstein, S., Factor, S., Jones, J., Ridzon, R., Williams, I., *et al.* (2002). Antimicrobial postexposure prophylaxis for anthrax: adverse events and adherence. *Emerg Infect Dis* 8, 1124-1132.

Shlyakhov, E.N., and Rubinstein, E. (1994). Human live anthrax vaccine in the former USSR. *Vaccine* 12, 727-730.

Singh, Y., Khanna, H., Chopra, A.P., and Mehra, V. (2001). A dominant negative mutant of *Bacillus anthracis* protective antigen inhibits anthrax toxin action in vivo. *The Journal of biological chemistry* 276, 22090-22094.

Singh, Y., Klimpel, K.R., Quinn, C.P., Chaudhary, V.K., and Leppla, S.H. (1991). The carboxyl-terminal end of protective antigen is required for receptor binding and anthrax toxin activity. *The Journal of biological chemistry* 266, 15493-15497.

Sirisanthana, T., and Brown, A.E. (2002). Anthrax of the gastrointestinal tract. *Emerg Infect Dis* 8, 649-651.

Smith, H., Keppie, J., and Stanley, J.L. (1953). The chemical basis of the virulence of *Bacillus anthracis*. I. Properties of bacteria grown in vivo and preparation of extracts. *Br J Exp Pathol* 34, 477-485.

Stanley, J.L., and Smith, H. (1961). Purification of factor I and recognition of a third factor of the anthrax toxin. *J Gen Microbiol* 26, 49-63.

Stern, E.J., Uhde, K.B., Shadomy, S.V., and Messonnier, N. (2008). Conference report on public health and clinical guidelines for anthrax. *Emerg Infect Dis* 14.

Sternbach, G. (2003). The history of anthrax. *J Emerg Med* 24, 463-467.

Sterne, M. (1937a). The effects of different carbon dioxide concentrations on the growth of virulent anthrax strains. Pathogenicity and immunity tests on guinea pigs and sheep with anthrax variants derived from virulent strains. *Onderstepoort Jour Vet Sci and Animal Indust* 9, 49-67.

Sterne, M. (1937b). Variations in *Bacillus anthracis*. *Onderstepoort Jour Vet Sci and Animal Indust* 8, 271-349.

Sterne, M. (1939). The use of anthrax vaccines prepared from avirulent (uncapsulated) variants of *Bacillus anthracis*. *Onderstepoort Jour Vet Sci and Animal Indust* 13, 307-312.

Sterne, M. (1946). Avirulent anthrax vaccine. *Onderstepoort Jour Vet Sci and Animal Indust* 21, 41-43.

Swartz, M.N. (2001). Recognition and management of anthrax--an update. *N Engl J Med* 345, 1621-1626.

Sweeney, D.A., Hicks, C.W., Cui, X., Li, Y., and Eichacker, P.Q. (2011). Anthrax infection. *American journal of respiratory and critical care medicine* 184, 1333-1341.

Szarowicz, S.E., During, R.L., Li, W., Quinn, C.P., Tang, W.J., and Southwick, F.S. (2009). Bacillus anthracis edema toxin impairs neutrophil actin-based motility. *Infection and immunity* 77, 2455-2464.

Tabatabaie, P., and Syadati, A. (1993). Bacillus anthracis as a cause of bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 12, 1035-1037.

Tang, W.J., and Guo, Q. (2009). The adenylyl cyclase activity of anthrax edema factor. *Molecular aspects of medicine* 30, 423-430.

Tonello, F., and Montecucco, C. (2009). The anthrax lethal factor and its MAPK kinase-specific metalloprotease activity. *Molecular aspects of medicine* 30, 431-438.

Tournier, J.N., Quesnel-Hellmann, A., Mathieu, J., Montecucco, C., Tang, W.J., Mock, M., Vidal, D.R., and Goossens, P.L. (2005). Anthrax edema toxin cooperates with lethal toxin to impair cytokine secretion during infection of dendritic cells. *J Immunol* 174, 4934-4941.

Tournier, J.N., Rossi Paccani, S., Quesnel-Hellmann, A., and Baldari, C.T. (2009a). Anthrax toxins: a weapon to systematically dismantle the host immune defenses. *Molecular aspects of medicine* 30, 456-466.

Tournier, J.N., Ulrich, R.G., Quesnel-Hellmann, A., Mohamadzadeh, M., and Stiles, B.G. (2009b). Anthrax, toxins and vaccines: a 125-year journey targeting Bacillus anthracis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7, 219-236.

Turnbull, P.C. (1991). Anthrax vaccines: past, present and future. *Vaccine* 9, 533-539.

Turnbull, P.C. (2002). Introduction: anthrax history, disease and ecology. *Current topics in microbiology and immunology* 271, 1-19.

Turnbull, P.C., Hutson, R.A., Ward, M.J., Jones, M.N., Quinn, C.P., Finnie, N.J., Duggleby, C.J., Kramer, J.M., and Melling, J. (1992). Bacillus anthracis but not always anthrax. *The Journal of applied bacteriology* 72, 21-28.

van der Goot, G., and Young, J.A. (2009). Receptors of anthrax toxin and cell entry. *Molecular aspects of medicine* 30, 406-412.

Vitale, G., Pellizzari, R., Recchi, C., Napolitani, G., Mock, M., and Montecucco, C. (1998). Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* 248, 706-711.

Wang, J.Y., Chang, A.H., Guttormsen, H.K., Rosas, A.L., and Kasper, D.L. (2003). Construction of designer glycoconjugate vaccines with size-specific oligosaccharide antigens and site-controlled coupling. *Vaccine* 21, 1112-1117.

Wang, J.Y., and Roehrl, M.H. (2005). Anthrax vaccine design: strategies to achieve comprehensive protection against spore, bacillus, and toxin. *Med Immunol* 4, 4.

Wang, T.T., Fellows, P.F., Leighton, T.J., and Lucas, A.H. (2004). Induction of opsonic antibodies to the gamma-D-glutamic acid capsule of *Bacillus anthracis* by immunization with a synthetic peptide-carrier protein conjugate. *FEMS Immunol Med Microbiol* 40, 231-237.

Welkos, S., Friedlander, A., Weeks, S., Little, S., and Mendelson, I. (2002). In-vitro characterisation of the phagocytosis and fate of anthrax spores in macrophages and the effects of anti-PA antibody. *J Med Microbiol* 51, 821-831.

Welkos, S.L., Keener, T.J., and Gibbs, P.H. (1986). Differences in susceptibility of inbred mice to *Bacillus anthracis*. *Infection and immunity* 51, 795-800.

Williams, J.L., Noviello, S.S., Griffith, K.S., Wurtzel, H., Hamborsky, J., Perz, J.F., Williams, I.T., Hadler, J.L., Swerdlow, D.L., and Ridzon, R. (2002). Anthrax postexposure prophylaxis in postal workers, Connecticut, 2001. *Emerg Infect Dis* 8, 1133-1137.

World Health Organization, I.O.o.E., Food and Agriculture Organization of the United Nations (2008). Anthrax in humans and animals, 4th edn (Geneva, Switzerland, World Health Organization).

Yan, M., and Collier, R.J. (2003). Characterization of dominant-negative forms of anthrax protective antigen. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 9, 46-51.

Yan, M., Roehrl, M.H., Basar, E., and Wang, J.Y. (2008). Selection and evaluation of the immunogenicity of protective antigen mutants as anthrax vaccine candidates. *Vaccine* 26, 947-955.

Young, J.A., and Collier, R.J. (2007). Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. *Annual review of biochemistry* 76, 243-265.

Zornetta, I., Brandi, L., Janowiak, B., Dal Molin, F., Tonello, F., Collier, R.J., and Montecucco, C. (2010). Imaging the cell entry of the anthrax oedema and lethal toxins with fluorescent protein chimeras. *Cell Microbiol* 12, 1435-1445.

Zwartouw, H.T., and Smith, H. (1956). Polyglutamic acid from *Bacillus anthracis* grown in vivo; structure and aggressin activity. *Biochem J* 63, 437-442.

Die vorliegende Arbeit wurde bereits 2005 mit Genehmigung des Promotionsbüros wie folgt publiziert und seither in zahlreichen anderen wissenschaftlichen Artikeln zitiert:

Aulinger, B.A., Roehrl, M.H., Mekalanos, J.J., Collier, R.J., and Wang, J.Y. (2005). Combining anthrax vaccine and therapy: a dominant-negative inhibitor of anthrax toxin is also a potent and safe immunogen for vaccines. *Infection and Immunity* 73, 3408-3414.

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Jürgen Heesemann für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die Unterstützung meines Forschungsaufenthaltes in Boston danken. Vor allem für die Offenheit und Flexibilität, das von mir vorgeschlagene Projekt im Ausland als Doktorvater zu betreuen und für die Geduld und das anhaltende Interesse an der Arbeit über die Jahre bin ich ausgesprochen dankbar.

Ganz herzlicher Dank gilt auch Dr. Julia Wang und Dr. Michael Roehrl, die mich in ihrem Labor in Boston aufnahmen und mir das Thema zur Dissertation überlassen haben. Durch meine Arbeit in ihrem Labor konnte ich meine ersten eigenständigen Schritte in der Forschung machen und grundlegende Techniken, vielmehr jedoch das analytische Denken und Problemlösen lernen. In ihrem Labor durfte ich eine arbeitsame, aber vor allem auch eine sehr spannende und lehrreiche Zeit meines Studiums verbringen.

Besonders möchte ich meinen Eltern, Dr. med. Tilly Aulinger und Dipl.-Ing. Günter Aulinger, denen diese Arbeit gewidmet ist, danken. Sie haben nicht nur mein Medizinstudium sowie den Forschungsaufenthalt in Boston ermöglicht, sondern vor allem auch immer an mich geglaubt, mich unterstützt, mir gut zuredet und hatten ein offenes Ohr wenn es mal nicht so gut lief. Vor allem aber danke ich ihnen für die bedingungslose Unterstützung und Zuneigung die ich jederzeit ungefragt in Anspruch nehmen durfte.

Danke an meine beiden großen Schwestern, Dr. Katharina Aulinger-Fuchs und Dr. Bernadette Aulinger, die als gute Vorbilder voranschritten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Dank gilt auch meiner Schwester Bernadette und meiner lieben Kollegin Dr. Tiina Rau für ihr Lektorat der frühen Manuskriptversionen.

Zuletzt möchte ich meiner Freundin Marta danken, die mich in der langen Zeit bis zur Fertigstellung der Dissertationsschrift immer wieder antrieb und mir in schwierigen Zeiten den Rücken frei gehalten hat.